

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1921-1922.

N° 2.

SUR L'APPLICATION AUX VÉGÉTAUX

du procédé biochimique de recherche du glucose

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le 17 Janvier 1922.

PAR

RENÉ ARNOLD

PHARMACIEN

LICENCIÉ ES-SCIENCES

PRÉPARATEUR AU COLLÈGE DE FRANCE

INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS.

JURY { MM. BOUGAULT, Président.
GRIMBERT, Professeur.
HÉRISSEY, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1921



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1921-1922.

N° 2.

SUR L'APPLICATION AUX VÉGÉTAUX

du procédé biochimique de recherche du glucose

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le 17 Janvier 1922.

PAR

RENÉ ARNOLD

PHARMACIEN

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

PRÉPARATEUR AU COLLÈGE DE FRANCE

INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS.

JURY { MM. BOUGAULT, Président.
GRIMBERT, Professeur.
HÉRISSEY, Agrégé.

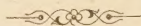
LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1921



PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE



ADMINISTRATION

MM. H. GAUTIER, Doyen, O. *, ☉ I.
RADAIS, Assesseur, *, ☉ I.
G. DURSANT, Secrétaire, *, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, C. *, ☉ I.....	Botanique générale.
VILLIERS, *, ☉ I.....	Chimie analytique.
H. GAUTIER, O. *, ☉ I.....	Chimie minérale.
RADAIS, *, ☉ I.....	Cryptogamie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, C. *, ☉ I.....	Chimie organique.
PERROT, O. *, ☉ I.....	Matière médicale.
COUTIÈRE, *, ☉ I.....	Zoologie.
BERTHELOT, Membre de l'Institut, ☉ I.....	Physique.
GRIMBERT, *, ☉ I.....	Chimie biologique.
LEBEAU, O. *, ☉ I.....	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, *, ☉ I.....	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ☉ I.....	Toxicologie.
BOUGAULT, ☉ I.....	Pharmacie galénique.

Doyen honoraire : M. GUIGNARD, C. *, ☉ I.

Professeur honoraire : M. MOUREU, C. *, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. TASSILLY, *, ☉ I.....	Minéralogie.
Marc HONNORAT, *, ☉ I....	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
GUÉRIN, ☉ I.....	Cryptogamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ☉ I.	MM. GUÉRIN, ☉ I.	MM. GORIS, *, ☉ I.
DAMIENS, ☉.	LUTZ, ☉ I.	LAUNOY, *, ☉.
TASSILLY, *, ☉ I.		HÉRISSEY, *, ☉ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, *, ☉ I.....	Chimie générale.
COUSIN, ☉ I.....	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.....	Micrographie.
LEROUX, ☉ I.....	Physique.
DEVAL, ☉ I.....	Microbiologie.
JAVILLIER, *, ☉ I.....	Travaux généraux de 4 ^e année.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER, *, ☉ I.

Bibliothécaire en Chef : M. DORVEAUX, ☉ I.

A LA MÉMOIRE DU PROFESSEUR ÉM. BOURQUELOT

PROFESSEUR DE PHARMACIE GALÉNIQUE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

A LA MÉMOIRE DE MON FRÈRE

TOMBÉ FACE A L'ENNEMI

DANS LES FLANDRES, LE 13 OCTOBRE 1917.

A MES PARENTS.

*Témoignage de vive affection et de
profonde reconnaissance.*

INTRODUCTION.

L'activité synthétisante de l'émulsine a été signalée, en 1912, par BOURQUELOT et BRIDEL (1). Cette découverte a permis aux mêmes auteurs de préparer un grand nombre de glucosides d'alcools. Dans un autre ordre d'idées, mettant à profit cette réaction spécifique de l'émulsine pour le glucose, BOURQUELOT et BRIDEL ont institué un procédé biochimique de caractérisation du glucose (2).

Ce procédé est basé sur le principe suivant : si, dans une solution alcoolique d'un mélange réducteur, on ajoute de l'émulsine, et, si on constate une diminution du pouvoir réducteur, c'est que le mélange renferme du glucose qui aura formé avec l'alcool un glucoside β non réducteur.

Ce procédé présente un certain nombre d'avantages sur les procédés actuels de caractérisation du glucose qui utilisent des propriétés n'appartenant d'ailleurs pas exclusivement à ce sucre, à savoir : 1° la réduction à chaud de la liqueur cupro-potassique ; 2° la fermentation alcoolique en présence de la levure de bière ; 3° la formation, par l'action de l'acétate de phénylhydrazine, d'une osazone reconnaissable à sa forme cristalline. Aucune de ces propriétés n'est en effet spécifique du glucose.

Ainsi les aldohexoses, les aldopentoses, les cétooses, le maltose, des glucosides comme la verbénaline, et même certains principes immédiats comme les tanins possèdent des propriétés réductrices.

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Sur une réaction synthétisante de l'émulsine. *Journ. de Pharm. et de Chim.*, [7], **5**, 1912, p. 569).

(2) Recherche et caractérisation du glucose dans les végétaux par un procédé biochimique nouveau (*Journ. Pharm. Chim.* [7] **22**, 1920, p. 209).

De même, le lévulose, le galactose, le maltose, le saccharose fermentent par la levure de bière

En outre, lévulose et mannose donnent avec la phénylhydrazine la même osazone que le glucose.

Ce procédé, par contre, utilise une réaction spécifique du glucose, et permet, par suite, de le caractériser en présence d'autres sucres réducteurs. Il fournit, de plus, des renseignements sur les proportions dans lesquelles le glucose existe.

Déjà, BOURQUELOT et BRIDEL l'ont mis en pratique pour la recherche du glucose, dans les baies de Genévrier, dans les produits retirés du *Loroglossum hircinum* et dans les produits d'hydrolyse fermentaire de l'inuline (1).

Dans le premier cas, ils ont pu caractériser 1 gr. 640 de glucose pour 100 gr. de baies et pour 8 gr., 376 de sucres réducteurs ; dans le deuxième cas, ils ont pu identifier le glucose dans un produit cristallisé qui se déposait au cours des opérations effectuées pour isoler le glucoside du *Loroglossum* ; et dans le troisième cas, l'application du procédé leur a permis de reconnaître qu'il n'existe pas de glucose dans les produits de l'hydrolyse fermentaire de l'inuline, et ils en concluent que l'inuline est uniquement constituée par l'union de molécules de fructose-d.

Enfin, une autre application a été l'élimination du glucose d'un milieu complexe où il existe : c'est ainsi que dans l'hydrolyse du gentianose réalisée en faisant agir l'émulsine sur ce sucre, ils ont pu séparer le glucose formé à l'état de méthylglucoside β et retirer le saccharose à l'état pur et cristallisé (1).

Le but de ce travail a été de savoir si ce procédé pouvait être mis en pratique sur les végétaux, et de préciser les meilleures conditions d'application.

(1) Application de la méthode biochimique de recherche du glucose à l'étude des produits de l'hydrolyse fermentaire de l'inuline (*Bull. Soc. Chim. biol.* **3**, 1921, p. 217).

(1) BOURQUELOT et BRIDEL : Obtention biochimique du sucre de canne à partir du gentianose (*Journ. de Pharm. et Chimie* [7], XXII, p. 241, 1920).

Mais, avant de généraliser les applications de ce nouveau procédé, il n'était pas inutile d'en vérifier l'efficacité dans le cas d'une forte quantité de sucres réducteurs, non plus dans une solution de produits purs, comme BOURQUELOT et BRIDEL l'avaient déjà fait dans un mélange de 12 parties de lévulose et 1 partie de glucose, mais dans un milieu naturel, tels que certains fruits (Fraises, Raisins) dans lesquels on sait que les sucres réducteurs sont constitués par un mélange à parties égales de glucose et de lévulose (sucre interverti).

Dans les essais dont nous avons déjà parlé, BOURQUELOT et BRIDEL ont choisi comme alcool l'alcool méthylique, parce que la glucosidification de cet alcool est facile à réaliser et que cet alcool présente encore un avantage appréciable sur l'alcool éthylique: on peut extraire facilement le méthylglucoside β formé dans la réaction et l'obtenir à l'état cristallisé, tandis que l'éthylglucoside β , qui est très hygroscopique, serait impossible à extraire à l'état pur et cristallisé des milieux complexes dans lesquels s'est faite la réaction.

L'obtention du produit de la réaction à l'état cristallisé est d'une grande importance, on a ainsi la preuve irréfutable de la présence du glucose. En effet, l'émulsine des amandes renferme toujours à côté de la glucosidase β une certaine quantité de galactosidase β qui, dans les conditions de l'expérience, peut combiner une faible proportion de galactose à l'alcool méthylique. Le pouvoir rotatoire du méthylglucoside β étant de $\alpha_D = -32^\circ,5$ et le méthylgalactoside β étant pratiquement inactif ($\alpha_D = -0^\circ,419$), il est facile de distinguer l'un de l'autre ces deux produits.

A ce propos, on a pensé qu'il serait peut-être possible de préparer une émulsine débarrassée de certains ferments, en particulier de la galactosidase β . C'est pourquoi, avant d'entreprendre ce travail, on a cherché à modifier la préparation de l'émulsine par l'emploi de divers agents de précipitation et à obtenir ainsi un produit fermentaire différant par quelques-unes de ses propriétés de l'émulsine ordinaire. On s'est servi dans ce but de l'acétone et

de l'alcool méthylique. Dans le produit obtenu en laissant le moins de contact possible avec chacun de ces précipitants, on a recherché les principaux ferments que l'on sait exister dans l'émulsine des amandes obtenues par précipitation avec l'alcool éthylique.

On avait cru remarquer que le précipité recueilli dans l'acétone avait une activité affaiblie en tant que galactosidase β , affaiblissement qui deviendrait peut-être plus sensible en prolongeant le séjour du ferment dans l'acétone. Cela était d'ailleurs d'accord avec les expériences de M. MOURNE qui était arrivé à détruire la galactosidase β de l'émulsine en laissant celle-ci en contact seize jours avec l'acétone à 80 p. 100 à une température de $+ 38^{\circ}$ - 40° (1).

On a préparé alors toute une série d'émulsines en laissant séjourner le précipité de plus en plus longtemps dans l'acétone du commerce à la température ordinaire. Contrairement à ce qu'on aurait pu croire, on n'a pu noter aucune modification pouvant faire soupçonner une atténuation de l'activité en tant que galactosidase β . Aussi, a-t-on dû garder comme produit fermentaire l'émulsine ordinaire ; la caractérisation du méthylglucoside β formé justifiant suffisamment la présence du glucose, comme on l'a fait remarquer dans les lignes ci-dessus.

Cependant, il n'a pas paru superflu de noter ici les résultats obtenus. Si ceux-ci n'ont pas été ce qu'on en attendait, ils n'en ont pas moins leur intérêt, puisqu'ils sont, en effet, l'origine de nouvelles préparations possibles d'émulsine, à condition qu'on ait soin d'éviter une action prolongée du précipitant.

Dans les expériences de mise au point du procédé, on a fait corrélativement des essais avec l'alcool éthylique dans le but de voir si la synthèse se faisait aussi bien dans les deux alcools.

Pour l'alcool méthylique, on a employé l'alcool à 50 p. 100 et l'alcool à 70 p. 100 (en poids) et pour l'alcool éthylique, l'alcool à 85° . BOURQUELOT et VERDON ont établi que l'équilibre est atteint après combinaison de 82,6 p. 100 du glucose dans l'alcool méthy-

(1) Contribution à l'étude de l'action synthétisante de la galactosidase β (Thèse Doct. Univ. (Pharmacie), p. 18, Paris, 1918).

lique à 70 p. 100 et de 69 p. 100 dans l'alcool méthylique à 50 p. 100 (1).

Dans l'alcool éthylique à 85°, il y a combinaison de 70 p. 100 du glucose (2).

Ce travail se divise en six chapitres. Dans le premier, on trouvera les essais faits pour modifier la préparation de l'émulsine dans le but d'en faire varier les propriétés, et en particulier, d'en éliminer la galactosidase β .

Dans le second, on étudiera l'application du procédé sur les Fraises et les Raisins, c'est-à-dire dans des produits naturels contenant une forte proportion de sucres réducteurs.

Un troisième chapitre sera consacré à la recherche du glucose dans un milieu plus complexe, tels que les feuilles sèches d'Eucalyptus, dans lesquelles on supposait que le glucose pouvait exister en petite quantité, et on cherchera à établir, par divers essais, les conditions les plus favorables au bon fonctionnement de la réaction.

L'exposé de la méthode adoptée fera le sujet du quatrième chapitre.

Dans le cinquième chapitre, on trouvera l'application de cette méthode :

I. — Aux fruits frais de *Virburnum opulus* L.

II. — A l'*extrait aqueux de quinquina* rouge du Codex de 1908.

III. — A l'*extrait alcoolique de Cola* du Codex de 1908.

IV. — A un *extrait alcoolique de Cola* obtenu en traitant les noix fraîches par l'alcool bouillant.

Enfin, un dernier chapitre sera réservé aux conclusions.

Avant d'entreprendre l'exposé de ces recherches, je considère comme un devoir d'adresser un hommage de profonde reconnais-

(1) BOURQUELOT et VERDON. — La réversibilité des actions fermentaires. Emulsine et méthylglucoside β . (*Journal Pharm. et Chimie* (7), VII, p. 377, 1913).

(2) BOURQUELOT et BRIDEL. — Synthèse de glucosides d'alcool à l'aide de l'émulsine. La réversibilité des actions fermentaires. (*Journ. Pharm. Chim.* (7), 6, 1912, p. 164).

sance à la mémoire de M. le Professeur Boutsquier, qui m'a donné le sujet de cette étude, et dont la bonté et la haute bienveillance m'ont permis l'accès de son laboratoire.

Enfin, il m'est particulièrement agréable de dire à M. Beuret, Pharmacien des Hôpitaux de Paris, combien je lui sais gré de l'intérêt qu'il m'a constamment témoigné, et de l'appui et des encouragements continuels qu'il m'a donnés au cours de ces recherches. J'ai largement mis à contribution son inlassable bienveillance dans les conseils quotidiens que j'ai sollicités de lui. Qu'il me permette de lui adresser un grand et cordial merci.

CHAPITRE PREMIER.

Sur la préparation de l'émulsine des amandes au moyen de divers agents de précipitation.

Jusqu'ici, on a toujours préparé l'émulsine des amandes, en suivant le procédé décrit par M. H. HÉRISSEY (1), ou un procédé analogue, c'est-à-dire en précipitant l'émulsine d'une macération aqueuse d'amandes douces par addition d'alcool éthylique à 95°, après avoir éliminé la caséine par l'acide acétique. L'émulsine que l'on obtient ainsi est un mélange de plusieurs ferments, dans lequel se trouve, en proportion plus grande, le ferment des glucosides β , c'est-à-dire l'émulsine proprement dite ou glucosidase β . On y a signalé la lactase, la gentiobiase, la cellobiase, la mélibiase, la manninotriase, la galactosidase β , ferments qui hydrolysent respectivement le lactose, le gentiobiose, le cellobiose, le mélibiose, le manninotriose, les galactosides β . Enfin, l'émulsine renferme toujours une faible quantité d'invertine.

On a voulu savoir si, en remplaçant, dans la précipitation de l'émulsine, l'alcool éthylique par d'autres liquides organiques miscibles à l'eau, on obtiendrait un produit fermentaire semblable à l'émulsine ordinaire, ou différant par quelques-unes de ses propriétés ?

On s'est adressé, pour cela, à l'alcool méthylique et à l'acétone du commerce.

Pour comparer l'activité des produits obtenus, on a opéré de la façon suivante :

Le macéré obtenu avec 3.000 gr. d'amandes douces, débarrassé de caséine par l'acide acétique et filtré, occupait un volume de

(1) Recherches sur l'émulsine (*Thèse Doct. Univ., Pharmacie*), p. 44, Paris, 1899.

4,675 cm³. On l'a divisé en 3 parties égales de 1,525 cm³. Dans la première partie, on a ajouté 2 volumes d'alcool à 95° 3,050 cm³ ; dans la deuxième, 2 volumes d'alcool méthylique, et dans la troisième, 2 volumes d'acétone. On a recueilli les précipités formés, de façon que le précipitant agisse le moins possible sur les ferments. Le précipité est resté vingt-huit heures en contact avec l'acétone, trente-et-une heures en contact avec l'alcool méthylique et quarante-huit heures en contact avec l'alcool éthylique. On a lavé les précipités à l'éther, on les a essorés et séchés dans le vide sulfurique. Les produits secs ont été pulvérisés. On a recueilli ainsi 24 gr. d'émulsine par l'acétone, 16 gr. d'émulsine par l'alcool éthylique et 15 gr. par l'alcool méthylique. La température au cours de l'expérience a été de + 15° environ.

On a essayé l'activité de ces trois sortes d'émulsine, que nous appellerons *émulsine acétonique*, *émulsine éthylique* et *émulsine méthylique*, en tant que glucosidase β , galactosidase β , lactase, gentiobiase, cellobiase et invertine, soit au point de vue hydrolytique, soit au point de vue synthétique : quelquefois aux deux points de vue.

I. *Glucosidase β* . — On a étudié l'activité hydrolysante et l'activité synthétisante de ce ferment, cette dernière, moins rapide dans les conditions expérimentales réalisées, permettant de comparer plus facilement les trois émulsines

1° *HYDROLYSE*. — On a fait agir chaque émulsine sur des solutions aqueuses de salicine et d'amygdaline, glucosides naturels, de méthylglucoside β et de benzylglucoside β , glucosides synthétiques. Pour cela, on a fait, d'une part, macérer pendant quarante-huit heures 0 gr. 50 de chaque émulsine dans 100 cm³ d'eau toluénée. On a filtré, on a obtenu, pour les trois émulsines, un liquide trouble qu'il a été impossible de clarifier suffisamment pour permettre un examen polarimétrique. D'autre part, on a dissous 2 gr. de chaque glucoside dans quantité suffisante d'eau toluénée pour faire 100 cm³. Chaque solution de glucoside a été divisée en trois parties.

Dans la première partie, on a ajouté un volume égal de macéré d'émulsine acétonique ; dans la deuxième partie, un volume égal de macéré d'émulsine éthylique ; dans la troisième partie, un volume égal de macéré d'émulsine méthylique. On a suivi au pola-

rimètre la marche de l'hydrolyse dans chaque mélange. Pour cela, l'examen polarimétrique direct étant impossible à cause de l'opalescence des macérés d'émulsine, on a fait, à intervalles variables, une prise d'essai qu'on a additionnée d'extrait de Saturne, puis de solution saturée au tiers de sulfate de soude. On a agité et on a filtré après un repos de cinq minutes. C'est sur le liquide ainsi déféqué qu'on a fait l'examen polarimétrique. On a obtenu les résultats suivants. Les chiffres ont été ramenés au liquide d'hydrolyse, c'est-à-dire à une solution de glucoside à 1 p. 100 ($l=2$).

	Durée de l'hydrolyse	Emulsine acétonique	Emulsine éthylrique	Emulsine méthylique
Amygdaline.....	0	— 1°44'	— 44'	— 44'
—	30 minutes	+ 24'	+ 24'	+ 20'
—	1 heure	+ 32'	+ 36'	+ 36'
—	2 heures	+ 36'	+ 36'	+ 36'
Salicine.....	0	— 1°16'	— 1°16'	— 1°16'
—	30 minutes	— 44'	— 24'	— 32'
—	2 heures	+ 8'	+ 12'	+ 8'
—	4 —	+ 24'	+ 28'	+ 24'
—	6 —	+ 28'	+ 28'	+ 28'
—	8 —	+ 28'	+ 28'	+ 28'
Benzylglucoside β.	0	— 1°6'	— 1°6'	— 1°6'
—	30 minutes	— 1°	— 1°	— 56'
—	17 heures	+ 28'	+ 28'	+ 28'
—	19 —	+ 28'	+ 28'	+ 28'
Méthylglucoside β.	0	— 42'	— 42'	— 42'
—	30 minutes	— 40'	— 40'	— 36'
—	17 heures	— 24'	— 20'	—
—	19 —	— 8'	= 0	— 4'
—	43 —	— 4'	+ 4'	+ 4'
—	5 jours	+ 4'	+ 42'	+ 24'
—	7 —	+ 8'	+ 28'	+ 32'

Remarquons d'abord la vitesse d'hydrolyse différente pour chaque glucoside, que M. BRIDEL a déjà signalée récemment (1).

Les trois émulsines ont agi de façon à peu près identique sur les quatre glucosides. Cependant, l'émulsine acétonique a hydrolysé un peu moins vite que les deux autres émulsines, la salicine et le méthylglucoside β , ce qui peut tenir à ce qu'on a obtenu, avec l'acétone, une plus grande proportion de produit fermentaire (21 gr. contre 16 gr. et 15 gr.).

2° SYNTHÈSE. — On a fait agir 1 gr. de chaque émulsine sur 100 cm³ d'une solution de glucose à 2 gr.,051 p. 100 dans l'alcool méthylique à 70 p. 100 en poids. Dans un tel liquide, la synthèse doit porter sur 82,6 p. 100 du glucose.

On a suivi la marche de la synthèse au polarimètre et l'on a dosé le sucre restant à la fin de la réaction.

Déviatiou ($l=2$)	Emulsine acétonique	Emulsine éthylque	Emulsine méthylque
Initiale.....	+ 2°10'	+ 2°10'	+ 2°10'
Après 6 jours.....	+ 30'	+ 26'	+ 34'
— 12 —	— 18'	— 22'	— 16'
— 19 —	— 42'	— 44'	— 42'
— 30 —	— 50'	— 46'	— 48'
Glucose restant p. 100 cm ³	0 gr.,350	0 gr.,355	0 gr.,355

La réaction était terminée au bout de trente jours et l'on peut dire qu'elle avait marché de façon sensiblement identique avec les trois émulsines qui possèdent donc la même activité.

II. *Galactosidase* β . — On a étudié également l'activité hydrolysante et l'activité synthétisante de ce ferment

1° HYDROLYSE. — On a fait agir 1 gr. de chaque émulsine sur 100 cm³ d'une solution aqueuse à 1 p. 100 d'éthylgalactoside β à l'étuve à + 30°. On a suivi la marche de l'hydrolyse en dosant le

(1) M. BRIDEL. — Sur la résistance des ferments de l'émulsine à l'action prolongée de l'alcool méthylique (*Journ. de Pharm. et de Chim.* (7), XXII, p. 323, 1920.

sucres réducteurs formés. On a obtenu les chiffres suivants, qui représentent la quantité de galactose formé pour 100 cm³.

Durée de l'hydrolyse	Emulsine acétonique	Emulsine éthylrique	Emulsine méthylique
20 heures.....	0 gr.,252	0 gr.,294	0 gr.,241
41 —	0 gr.,342	0 gr.,417	0 gr.,374
4 jours.....	0 gr.,524	0 gr.,744	0 gr.,573
7 —	0 gr.,666	6 gr.,760	0 gr.,717

L'émulsine acétonique agit ici notablement moins vite que l'émulsine éthylrique. L'émulsine méthylique possède une activité plus faible que celle de l'émulsine éthylrique et plus forte que celle de l'émulsine acétonique.

2° SYNTHÈSE. — On a fait agir à + 30°, 1 gr. de chaque émulsine sur 100 cm³ d'une solution de galactose à 0 gr.,948 p. 100 dans l'alcool éthylrique à 80°. On a suivi la réaction au polarimètre et l'on a dosé le galactose restant, le 36° jour.

Durée de la synthèse	Emulsine acétonique	Emulsine éthylrique	Emulsine méthylique
0.....	+ 1°18'	+ 1°18'	+ 1°18'
5 jours.....	+ 1° 6'	+ 1° 4'	+ 1° 2'
10 —	+ 54'	+ 52'	+ 48'
23 —	+ 40'	+ 32'	+ 36'
36 —	+ 32'	+ 26'	+ 28'
Galactose restant.....	0 gr.,578	0 gr.,476	0 gr.,481

On voit que l'émulsine acétonique a combiné, dans le même temps, moins de galactose que les deux autres, 39,2 p. 100 au lieu de 49,78 pour l'émulsine éthylrique et 49,26 pour l'émulsine méthylique.

La précipitation par l'acétone aurait donc diminué sensiblement l'activité de la galactosidase β .

III. *Lactase*. — On a fait agir 0 gr.,50 de chaque émulsine sur 50 cm³ d'une solution aqueuse de lactose à 0 gr.,954 p. 100, à + 30°. On a suivi la marche de l'hydrolyse en dosant le sucre réducteur. On a obtenu les chiffres suivants, indiquant le pourcentage de lactose hydrolysé.

Durée de l'hydrolyse	Emulsine acétonique	Emulsine éthylique	Emulsine méthylique
6 heures.....	16 gr.,66	16 gr.,66	16 gr.,66
12 —	55 gr.,42	55 gr.,42	55 gr.,42
48 —	82 gr.,55	82 gr.,55	82 gr.,55
4 jours	100 gr.	98 gr.,06	98 gr.,06

Les chiffres obtenus sont assez voisins pour qu'on puisse dire que l'activité de la lactase n'a pas été influencée par l'agent de précipitation, dans les conditions de l'expérience.

Une autre expérience semble montrer que la durée du contact du précipité avec le précipitant, doit avoir une action nocive sur la lactase.

On a préparé un autre échantillon d'émulsine au moyen de l'alcool méthylique et on a laissé le précipité en contact avec l'alcool méthylique, près de quatre jours, à une température de + 22°-25°, avant de le recueillir.

L'émulsine ainsi obtenue, essayée sur la même solution de lactose, n'a hydrolysé, en six jours, que 30,64 p. 100 du lactose. La lactase avait donc été partiellement détruite au cours de la préparation.

IV. *Gentiobiase et cellobiase*. — On a fait agir 1 gr. de chaque émulsine sur 100 cm³ d'une solution de glucose à 61 gr.,719 p. 100 cm³. On sait que, dans ces conditions, il y a formation de bioses parmi lesquels se trouvent le gentiobiose et le cellobiose, produits par l'action synthétisante de la gentiobiase et de la cellobiase. On a suivi la marche de la synthèse au polarimètre ($l=2$).

La synthèse a été plus rapide au début avec l'émulsine éthylique qui, en dix-sept jours, a produit une diminution de 8°14', l'émul-

sine méthylique ayant produit une diminution de 7°18' et l'émulsine acétonique de 6°28'. Mais, déjà au bout de 37 jours, la synthèse était au même point dans les trois liquides.

Durée de la synthèse	Emulsine acétonique	Emulsine éthylique	Emulsine méthylique
0.....	+ 64°18'	+ 64°18'	+ 64°18'
6 jours.....	+ 60°32'	+ 59°48'	+ 60°16'
17 —	+ 57°40'	+ 56° 4'	+ 57°;
26 —	+ 55°48'	+ 55°20'	+ 55°40'
37 —	+ 55° 8'	+ 55° 8'	+ 55°16'
49 —	+ 54°48'	+ 54°56'	+ 55°
78 —	+ 54°36'	+ 54°40'	+ 54°52'

V. *Invertine*. — On a fait agir 2 gr. de chaque émulsine sur 100 cm³ d'une solution aqueuse de saccharose à 5 p. 100. Cette solution avait une déviation de +6°30' ($l = 2$) devant passer à — 2°12' environ, après hydrolyse totale.

Pour suivre la marche de l'hydrolyse au polarimètre, il a fallu déféquer à l'extrait de Saturne et au sulfate de soude et filtrer, comme dans les essais d'hydrolyse de glucosides. On a obtenu les résultats suivants :

Durée de l'hydrolyse	Emulsine acétonique	Emulsine éthylique	Emulsine méthylique
10 jours.....	+ 52'	— 40'	— 1°52'
15 —	— 52'	— 2°	— 2°16'
27 —	— 2°12'	— 2°12'	— 2°16'

On arrive, avec les trois émulsines, à l'hydrolyse totale, et c'est l'émulsine méthylique qui a produit l'hydrolyse la plus rapide.

On a signalé plus haut (page 16), que le temps de contact de l'émulsine fraîchement précipitée, avec l'alcool méthylique, avait une influence nocive sur la lactase. Nous avons voulu voir s'il en

était de même sur l'invertine, ce que faisait d'ailleurs prévoir un travail de BOURQUELOT et BRIDEL, qui ont reconnu que l'invertine n'agit pas sur le saccharose en solution dans des alcools méthyliques à 50, 60, 70 et 80 p. 100 en poids et que ce ferment est tué par un contact de douze jours avec l'alcool méthylique à 50 p. 100 (1).

L'émulsine, dans laquelle on avait reconnu une diminution de l'activité de la lactase, a été essayée sur la même solution de saccharose que les trois autres et dans les mêmes proportions. La baisse de la déviation a été faible :

Durée de l'hydrolyse	Rotations observées ($l=2$)
0.....	+ 6°30'
5 jours.....	+ 6°6'
10 —.....	+ 5°58'
26 —.....	+ 5°34'

soit, en vingt-six jours, une diminution de rotation de 56', correspondant à une hydrolyse de 0 gr.,534 de saccharose pour 100 cm³. Cette émulsine ne renferme donc que des traces d'invertine.

En résumé, si on remplace, dans la précipitation de l'émulsine, l'alcool éthylique par l'alcool méthylique ou par l'acétone, en ayant soin d'éviter une action prolongée du précipitant, on obtient un produit fermentaire possédant sensiblement les mêmes propriétés que l'émulsine ordinaire.

En outre, les résultats obtenus sur la galactosidase β , la lactase et l'invertine, semblent montrer qu'en prolongeant le contact de l'émulsine fraîchement précipitée avec le liquide dans lequel s'est fait la précipitation, on pourrait obtenir une émulsine débarrassée de certains ferments (2).

Seules, les modifications touchant l'activité de la galactosidase β pouvaient être intéressantes au point de vue qui nous occupe, et, c'est pourquoi on a préparé toute une série d'émulsines acétoniques dans lesquelles on a spécialement recherché la présence de la galactosidase β en s'appuyant sur l'action synthétisante qu'elle exerce sur le galactose en solution dans l'alcool méthylique.

(1) Em. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — Action de l'invertine sur le sucre de canne dans des alcools méthylique et éthylique de différents titres (*Journ. de Pharm. et de Chim.* (7) IX, p. 321, 1914).

(2) M. BRIDEL et R. ARNOLD. — Sur l'emploi de divers agents de précipitation dans la préparation de l'émulsine des amandes (*Bull. Soc. Chim. biol.*, II, p. 216, 1920).

On a ensuite fait agir, à $+ 27^{\circ}$, 0,50 de chaque émulsine sur 50 cm³ d'une solution de galactose à 0 gr.,976 p. 100 dans l'alcool éthylique à 80° .

On a dosé le galactose restant dans chaque essai tous les cinq jours. Les résultats sont résumés dans le tableau p. 19.

On ne note donc aucun arrêt sensible dans la diminution de la proportion de galactose combiné, et on peut en conclure que le contact dans l'acétone à la température ordinaire n'amène aucune modification de l'activité de l'émulsine en tant que galactosidase β .

Si bien que tous les essais de caractérisation du glucose entrepris dans ce travail ont été faits avec l'émulsine ordinaire, pouvant évidemment amener la combinaison du galactose, et par là fausser l'essai quantitatif par excès ; mais, il n'en reste pas moins vrai que l'obtention du méthylglucoside β à l'état cristallisé et sa caractérisation par le pouvoir rotatoire sont des preuves suffisantes de la présence du glucose, le pouvoir rotatoire du méthylgalactoside β étant à peu près nul ($\alpha_D = -0^{\circ},419$) et celui du méthylglucoside β étant $\alpha_D = -32^{\circ},5$.

CHAPITRE II.

Essai de caractérisation biochimique du glucose dans les Fraises et dans les Raisins.

I. — Fraises.

On a projeté dans deux litres d'alcool à 85° bouillant 1.500 gr. de Fraises fraîches privées du calice, et on a maintenu à l'ébullition une demi-heure. On a décanté et on a exprimé à la presse ; on a recueilli 3 litres de liqueur qu'on a additionnée d'un litre d'alcool à 95° afin de provoquer la précipitation de la pectine. On a filtré et on a partagé le filtrat en deux parties égales dont chacune a servi à un essai de caractérisation biochimique du glucose, l'une au moyen de l'alcool éthylique, l'autre de l'alcool méthylique.

1. *Essai de caractérisation dans l'alcool éthylique.* — On a évaporé à sec sous pression réduite la première partie en présence de carbonate de chaux, et on a repris l'extrait à froid par quantité suffisante d'alcool éthylique à 85° pour faire 250 cm³. On a dosé la quantité de sucres réducteurs existant dans le liquide filtré. On a additionné la liqueur d'émulsine (1 gr.) et on l'a abandonnée à la température du laboratoire, en agitant journellement. Tous les cinq jours, on a effectué un dosage des sucres réducteurs. On a obtenu les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	5 gr.,438	pour 100 cm ³
— — le 5 ^e jour.....	4 gr.,900	—
— — le 10 ^e —	4 gr.,476	—
— — le 15 ^e —	4 gr.,276	—
— — le 20 ^e —	3 gr.,972	—
— — le 25 ^e —	3 gr.,755	—
— — le 30 ^e —	3 gr.,755	—

On a ajouté alors une nouvelle quantité d'émulsine et on a dosé le sucre réducteur quarante jours après. On n'a trouvé aucune variation. La synthèse était donc terminée. Il a disparu 1 gr.,683 de sucres réducteurs. Or, on sait que dans l'alcool éthylique à 85°, on combine 70 p. 100 du glucose existant ; d'après cet essai, il y aurait donc 2 gr.,404 de glucose, soit 44,2 de glucose p. 100 des sucres réducteurs.

2. *Essai de caractérisation dans l'alcool méthylique.* — On a évaporé la seconde partie du filtrat en présence de carbonate de chaux, et on a repris à froid par l'alcool méthylique à 50 p. 100 en poids en quantité suffisante pour faire 250 cm³ après filtration. On a dosé la quantité de sucres réducteurs dans cette liqueur, et on y a ajouté ensuite un gramme d'émulsine. Les dosages successifs faits dans les mêmes conditions que ci-dessus ont donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	5 gr.,793	pour 100 cm ³
— — le 5 ^e jour.....	5 gr.,035	—
— — le 10 ^e —.....	4 gr.,533	—
— — le 15 ^e —.....	4 gr.,305	—
— — le 20 ^e —.....	4 gr.,148	—
— — le 25 ^e —.....	4 gr.,055	—
— — le 30 ^e —.....	3 gr.,901	—
— — le 70 ^e —.....	3 gr.,901	—

La quantité de sucre réducteur disparue est de 1 gr.,892. Comme avec l'alcool méthylique à 50 p. 100, l'équilibre est atteint après disparition de 69 p. 100 du glucose, la quantité de glucose existant sur 5 gr.,793 de sucres réducteurs est donc de 2 gr.,742 soit 47,1 pour 100.

Une nouvelle série d'essais a été faite sur 1.500 gr. de fruits, ayant subi, en plus du traitement décrit au début de ce chapitre, une défécation au sous-acétate de plomb. On a dissous dans 1000 cm³ d'eau distillée l'extrait provenant du traitement à l'alcool bouillant et pesant 167 gr., et on a additionné la solution obtenue de 45 cm³ de sous-acétate de plomb, quantité nécessaire pour obtenir une défécation complète. On a éliminé, après essorage, le plomb en excès par un courant d'hydrogène sulfuré. On a filtré et on a évaporé la liqueur sous pression réduite, au B.-M, sans dépasser + 50°. L'extrait à ce moment ne pesait plus que 97 gr. Le sous-acétate de plomb avait ainsi enlevé 70 gr. de produits soit 41,9

p. 100. Finalement, on a dissous l'extrait déféqué dans l'eau distillée en quantité suffisante pour faire 300 cm³, et cette solution a servi aux deux essais de caractérisation suivants :

1. *Essai de caractérisation dans l'alcool éthylique.* — On a évaporé à sec 100 cm³ de solution en présence de carbonate de calcium, on a repris par de l'alcool à 85°, en quantité suffisante pour faire 250 cm³ et on a ajouté de l'émulsine.

Les dosages des sucres réducteurs ont donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	7 gr.,400 pour 100 cm ³
— — le 5 ^e jour.....	6 gr.,788 —
— — le 10 ^e —	5 gr.,936 —
— — le 15 ^e —	5 gr.,884 —
Nouvelle émulsine le 15 ^e jour.	
Sucre réducteur le 40 ^e jour.....	4 gr.,834 pour 100 cm ³
— — le 55 ^e —	4 gr.,834 —

Le sucre réducteur disparu est donc de 2 gr.,566 pour 100 cm³ correspondant à 3 gr.,666 de glucose, soit 49,54 p. 100.

Afin de se rendre compte si dans un tel milieu l'équilibre était bien atteint, on a ajouté une quantité de glucose correspondant à 1 gr.,102 pour 100 cm³. On a fait agir l'émulsine.

Sucre réducteur après addition de glucose....	5 gr.,936 pour 100 cm ³
— après action de 10 jours.....	5 gr.,252 —
— — — 18 —	5 gr.,252 —
— — — 38 —	5 gr.,168 —

La quantité de glucose disparue était donc de 0 gr.,768 p. 100 cm³.

Or, dans l'alcool éthylique à 85°, on doit combiner 70 p. 100 du glucose ; pour 1 gr.,102 de glucose existant, il doit donc en disparaître 0 gr.,771. Ce chiffre est très voisin de celui que donne le dosage, et on peut en conclure que cet essai de caractérisation décèle bien tout le glucose et peut servir également d'essai quantitatif.

2. *Essai de caractérisation dans l'alcool méthylique.* — On a évaporé à sec sous pression réduite 100 cm³ de la solution faite avec l'extrait déféqué, en présence de carbonate de chaux, et on a repris par l'alcool méthylique à 50 p. 100 en quantité suffisante pour faire 250 cm³. On a fait agir l'émulsine.

Les dosages ont donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	7 gr.,726	pour 100 cm ³
— — le 5 ^e jour.....	7 gr.,076	—
— — le 10 ^e —	6 gr.,422	—
— — le 15 ^e —	6 gr.,000	—
— — le 20 ^e —	5 gr.,778	—

Nouvelle émulsine le 20^e jour.

Sucre réducteur le 38 ^e jour.....	5 gr.,146	pour 100 cm ³
— — le 47 ^e —	5 gr.,146	—

La quantité de sucre disparue est donc de 2 gr.,580 quantité correspondant à 3 gr.,739 de glucose soit 48,39 p. 100.

Dans cet essai, on a isolé le méthylglucoside β à l'état cristallisé. Pour cela, on a évaporé à sec, après filtration, la liqueur fermentaire restante, et on a traité l'extrait à trois reprises par 400 cm³ d'éther acétique hydraté et bouillant. On a distillé les liqueurs éthero acétiques à sec et on a dissous le résidu dans 50 cm³ d'eau. La liqueur obtenue étant colorée, on l'a agitée avec du noir animal et on l'a filtrée après un repos de 24 heures. On a évaporé à sec sous pression réduite la liqueur decolorée et on a repris le résidu à l'ébullition par 10 cm³ d'un mélange à parties égales d'alcool à 95° et d'éther acétique anhydre. Après filtration à chaud, refroidissement et repos, on a vu apparaître des cristaux. Ceux-ci ont été essorés et séchés, et purifiés par cristallisation dans l'alcool à 95°. Après dessiccation à l'air, ils avaient un pouvoir rotatoire de $\alpha_D = -31^{\circ},37$.

$$(p = 0 \text{ gr.,1708 } v = 10 \text{ cm}^3 \quad l = 2 \quad \alpha = -1^{\circ},4')$$

Or, le méthylglucoside β a comme pouvoir rotatoire $\alpha_D = -32^{\circ},5$.

On voit donc qu'il est possible de caractériser sûrement le glucose dans un milieu naturel riche en autres produits réducteurs. La défécation a produit une sensible amélioration dans la proportion de glucose combiné. En effet, dans la première série d'essais, où l'on n'a fait qu'un traitement à l'alcool, on a caractérisé le glucose dans les proportions de 44,2 p. 100 en milieu éthylique et de 47,1 p. 100 en milieu méthylique, alors que, dans les mêmes milieux, ces proportions atteignent après défécation, respectivement 49,51 pour 100 et 48,39 p. 100.

II. — Raisins.

On a fait des essais semblables sur les Raisins où l'on sait depuis longtemps qu'il existe une grande quantité de glucose, sucre qu'on appelle encore quelquefois « sucre de raisin ».

On a traité 1.370 gr. de fruits frais par l'alcool à 85° bouillant : on a distillé l'alcool au B. M. et on a divisé le résidu aqueux en quatre parties: A, B, C, D, qu'on a traitées de la façon suivante :

A et B : Evaporation à sec sous pression réduite en présence de carbonate de chaux et reprise de A par l'alcool méthylique à 50 p. 100, et de B par l'alcool éthylique à 85°.

C et D : Défécation à l'extrait de Saturne, essorage du précipité plombique, élimination de l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré, évaporation à sec sous pression réduite en présence de carbonate de chaux et reprise de C par l'alcool méthylique à 50 p. 100 et de D par l'alcool éthylique à 85°.

Extraits non déféqués.

A. *Alcool méthylique.* — L'extrait a été repris par quantité suffisante d'alcool méthylique à 50 p. 100 pour faire 500 cm³. On a fait agir l'émulsine à la dose de 0,50 pour 100 cm³. On a noté les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	11 gr.,104 pour 100 cm ³
— — le 20 ^e jour.....	8 gr.,222 —
— — le 31 ^e —	7 gr.,772 —
— — le 44 ^e —	7 gr.,772 —

Nouvelle émulsine le 44^e jour.

Sucre réducteur le 55 ^e jour.....	7 gr.,720 pour 100 cm ³
— — le 62 ^e —	7 gr.,615 —
— — le 80 ^e —	7 gr.,205 —
— — le 90 ^e —	7 gr.,205 —

La quantité de sucre disparue est donc de 3 gr.,899 pour 100 cm³, correspondant à 5 gr.,650 de glucose, soit 50,8 p. 100 des sucres réducteurs.

Une addition de glucose correspondant à 1 gr.,085 pour 100 cm³ a amené une nouvelle réaction synthétisante qui s'est arrêtée quand la quantité de sucres réducteurs a été de 7 gr.,550 pour 100 cm³,

soit une disparition de 0 gr.,740 de glucose : or, le chiffre donné par la théorie est de 0 gr.,748. On peut donc considérer que dans cet essai, l'équilibre avait été atteint avant l'addition du glucose.

B. *Alcool éthylique.* — Avant d'étudier l'action fermentaire, on a voulu se rendre compte si l'évaporation à sec sous pression réduite laissait dans l'extract une quantité d'eau assez forte pour amener une dilution du dissolvant, dilution qui aurait influencé l'état d'équilibre.

Pour cela, on a déterminé sur une prise d'essai du liquide aqueux, le résidu fixe à -110° , on a trouvé que ce liquide devait contenir 61 gr.,400 de résidu sec. Evaporé dans le vide, on a trouvé un poids de 65 gr., soit 3 gr.,600 d'eau, quantité que l'on peut considérer comme négligeable, puis qu'on a repris l'extract par quantité suffisante d'alcool à 85° pour faire 500 cm³.

L'action de l'émulsine a donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	10 gr.,188 pour 100 cm ³
— — le 10 ^e jour.....	8 gr.,276 —
— — le 40 ^e —	7 gr.,08 —
— — le 55 ^e —	6 gr.,914 —
— — le 65 ^e —	6 gr.,914 —

Nouvelle émulsine le 65^e jour

Sucre réducteur le 75 ^e —	6 gr.,446 pour 100 cm ³
— — le 105 ^e —	6 gr.,320 —

soit une diminution de 3 gr.,868 de sucre correspondant à 5 gr.,525 de glucose, quantité représentant 54,2 p. 100 des sucres réducteurs.

Après cette action, on a ajouté une quantité de glucose correspondant à 1 gr.,168 pour 100 cm³, et on a fait agir l'émulsine.

Sucre réducteur après addition de glucose	7 gr.,488 pour 100 cm ³
— — le 10 ^e jour.....	6 gr.,914 —
— — le 30 ^e —	6 gr.,756 —
— — le 90 ^e —	6 gr.,700 —

soit une disparition de 0 gr.,788 de sucre, voisin du chiffre théorique 0 gr.,817.

Extraits déféqués.

C. Alcool méthylique. — L'extrait pesait 57 gr. au lieu de 65 gr. comme dans l'essai correspondant ci-dessus. Les produits enlevés par le plomb représentent donc 12,3 p. 100, soit une proportion relativement faible, en tout cas, en bien plus faible proportion que dans les Fraises. On a repris cet extrait par l'alcool méthylique à 50 p. 100 en quantité suffisante pour 500 cm³. L'action de l'émulsine fut la suivante :

Sucre réducteur initial.....	10 gr.,410	pour 100 cm ³
— — le 10 ^e jour.....	8 gr.,400	—
— — le 19 ^e —	7 gr.,720	—
— — le 30 ^e —	7 gr.,092	—
— — le 40 ^e —	7 gr.,024	—
— — le 50 ^e —	7 gr.,024	—
Nouvelle émulsine le 50 ^e jour.		
Sucre réducteur le 70 ^e —	6 gr.,620	—

Il y a eu, par conséquent 3 gr.,790 de sucre disparu, correspondant à 5 gr. 492 de glucose soit 52,7 p. 100 des sucres réducteurs. Pour savoir si l'équilibre était atteint, on a ajouté une quantité de glucose correspondant à 1 gr.,312 pour 100 cm³. Sous l'influence de l'émulsine, on a noté les résultats suivants :

Sucre réducteur après addition de glucose	7 gr.,932	pour 100 cm ³
— — le 8 ^e jour.....	7 gr.,128	—
— — le 50 ^e —	7 gr.,021	—

soit une disparition de 0 gr.,911 de glucose, voisine de celle prévue par la théorie 0 gr.,905.

L'équilibre était donc atteint, le 70^e jour, au moment où on a ajouté le glucose

D. Alcool éthylique. — L'extrait a été repris par l'alcool à 85^e en quantité suffisante pour faire 500 cm³. L'action de l'émulsine a donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial	9 gr.,954	pour 100 cm ³
— — le 10 ^e jour.....	9 gr.,066	—
— — le 25 ^e —	8 gr.,200	—
— — le 35 ^e —	7 gr.,666	—
— — le 50 ^e —	7 gr.,186	—
— — le 60 ^e —	7 gr.,134	—
Nouvelle émulsine le 60 ^e jour.		
Sucre réducteur le 70 ^e —	6 gr.,444	—
— — le 100 ^e —	6 gr.,396	—

soit une disparition de 3 gr.,558 de sucre réducteur correspondant à 5 gr.,082 de glucose, soit 51 p. 100 des sucres réducteurs.

L'addition de glucose a donné également la preuve que l'équilibre était atteint. Sur 0 gr.,730 de glucose ajouté pour 100 cm³, on a fait disparaître 0 gr.,530, chiffre très proche de celui fourni par la théorie : 0 gr.,511.

Dans l'ensemble, les proportions de glucose trouvé oscillent autour de 50 p. 100 : 50,8 et 54,2 p. 100 dans les extraits non déféqués, 52,7 et 51 p. 100 dans les extraits déféqués.

La méthode biochimique de caractérisation du glucose trouve donc une nouvelle preuve de son application, malgré la présence très élevée d'autres sucres réducteurs. Mais, la défécation au plomb ne paraît pas avoir eu ici la même influence favorisante que pour les Fraises. Cela tient vraisemblablement à ce que cette défécation a porté sur une faible proportion des principes existant dans les Raisins, et que ces principes précipitables par le plomb n'avaient pas d'action nocive sur l'activité de l'émulsine.

Les essais faits sur les Fraises ont montré néanmoins que la défécation était nécessaire. Les essais que l'on trouvera au chapitre suivant sur les feuilles sèches d'Eucalyptus viennent encore en faveur de la nécessité d'une défécation.

CHAPITRE III.

Essai de caractérisation biochimique du glucose dans les feuilles sèches d'*Eucalyptus globulus* L.

On vient de voir que dans des fruits, même en présence de fortes quantités d'autres sucres réducteurs (lévulose, par exemple), le glucose pouvait se combiner aux alcools méthylique et éthylique, dans les mêmes conditions que s'il était seul en solution. Dans les essais sur les Fraises et sur les Raisins, si les quantités de glucose étaient particulièrement élevées, les produits étrangers pouvant gêner la réaction étaient par contre en faible quantité. Aussi a-t-on pu remarquer que la défécation plombique n'avait amené qu'une faible variation dans les proportions de sucre combiné.

On a pensé qu'en s'adressant à un produit ne renfermant qu'une faible quantité de produits réducteurs, à côté d'autres principes immédiats, tanins, résines, etc..., on se trouverait en présence d'un milieu plus complexe dans lequel il serait intéressant de caractériser le glucose. C'est pourquoi on a choisi les feuilles d'Eucalyptus. On s'est efforcé d'obtenir une liqueur contenant le moins possible de produits étrangers et le maximum de sucres. Pour cela, on a mis à profit la propriété que possède l'alcool à 95° de dissoudre à l'ébullition la plupart des sucres et la marche suivie dans une première série d'essais fut la suivante.

On a traité 335 gr. de feuilles sèches pulvérisées par l'alcool bouillant. Après refroidissement, on a décanté la liqueur alcoolique, on l'a filtrée et évaporée à sec sous pression réduite. On a obtenu ainsi 75 gr. d'extract. On a épuisé celui-ci à l'ébullition par l'éther acétique hydraté qui a dissous 10 gr. de matières résineuses et de matières grasses. Sur l'extract ainsi épuisé, on a procédé à 3 traitements à l'alcool à 95° bouillant, d'une durée de 20 minutes. Pour

chacun d'eux on a utilisé 1.000 cm³ d'alcool, qu'on a laissé 24 heures en contact avec l'extrait avant de décantier et de filtrer. Un dosage des sucres réducteurs dans ces liqueurs a permis de reconnaître que trois traitements étaient suffisants. Les liqueurs alcooliques ont été réunies et évaporées à sec sous pression réduite ; on a obtenu 37 gr. d'extrait soit 11 p. 100 des feuilles ; on a repris l'extrait par l'eau distillée et on a obtenu une solution trouble qu'on a filtrée après agitation avec du carbonate de chaux. On a partagé le filtrat en deux moitiés dont l'une a servi pour l'essai en milieu méthylique et l'autre pour l'essai en milieu éthylique.

Essai en milieu méthylique. — La première moitié a été évaporée à sec sous pression réduite et l'extrait a été repris par l'alcool méthylique à 70 p. 100 en quantité suffisante pour faire 250 cm³. On a fait agir l'émulsine.

Les dosages de sucres ont donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	1 gr.,325	pour 100 cm ³
— — le 5 ^e jour.....	1 gr.,13	—
— — le 12 ^e —	1 gr.,13	—
Nouvelle émulsine le 12 ^e jour		
Sucre réducteur le 18 ^e jour.....	1 gr.,06	pour 100 cm ³
— — le 23 ^e —	1 gr.,06	—
— — le 120 ^e —	0 gr.,951	—

soit une disparition de 0 gr.,374 de sucre, on sait que dans l'alcool méthylique à 70 p. 100 l'équilibre est atteint après disparition de 82,6 p. 100 de glucose, le sucre combiné correspond dans cet essai à 0 gr.,453 de glucose, soit 34,1 p. 100 des produits réducteurs.

Essai en milieu éthylique. — La seconde moitié a été évaporée à sec sous pression réduite, et l'extrait a été repris par l'alcool éthylique à 85° en quantité suffisante pour faire 250 cm³. Sous l'action de l'émulsine, les dosages successifs de sucres réducteurs ont donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	1 gr.,31	pour 100 cm ³
— — le 5 ^e jour.....	1 gr.,20	—
— — le 10 ^e —	1 gr.,20	—
Nouvelle émulsine le 10 ^e jour		
Sucre réducteur le 15 ^e jour.....	1 gr.,13	pour 100 cm ³
— — le 20 ^e —	1 gr.,13	—
— — le 120 ^e —	1 gr.,036	—

il y a eu disparition de 0 gr.,274 de sucre réducteur correspondant à 0,391 de glucose, soit 29,84 p. 100 des sucres réducteurs.

Ces deux essais indiquent nettement la présence dans les feuilles d'Eucalyptus d'un sucre qui s'est combiné aux alcools sous l'influence de l'émulsine. Pour affirmer que ce sucre est bien du glucose, on a cherché à isoler le produit formé malgré la faible action synthétique de l'émulsine.

Pour cela, on a évaporé à sec la liqueur fermentaire de l'essai en milieu méthylrique, et on a traité l'extrait par l'éther acétique hydraté et bouillant, en quatre reprises de 100 cm³. On a distillé les liqueurs éthero-acétiques, et on a repris le résidu par l'eau distillée. La solution aqueuse, très fortement colorée, a été déféquée au sous-acétate de plomb et le filtrat a été évaporé sous pression réduite et repris par 10 cm³ d'un mélange à parties égales d'éther acétique et d'alcool à 95°. Après filtration et refroidissement, cette liqueur éthéro-alcoolique n'a laissé apparaître que quelques cristaux. Pour mieux mettre en évidence la présence de méthylglucoside β , il a fallu évaporer au B. M. sur un verre de montre la liqueur éthéro-alcoolique et, dans l'extrait sirupeux obtenu, on a vu se former au bout de quelques jours les cristaux caractéristiques du méthylglucoside β . Une lamelle recouverte d'un enduit de cet extrait sirupeux a permis, d'autre part, de suivre au microscope la formation de chapelets de cristaux tabulaires caractéristiques.

Mais, ce traitement par l'alcool à 95° était-il suffisant pour pouvoir affirmer que tout le glucose existant dans les feuilles d'Eucalyptus était combiné dans les proportions voulues par l'équilibre ? Cet essai pouvait-il être quantitatif ? En d'autres termes, l'action de l'émulsine n'était-elle pas encore partiellement paralysée ? Afin de vérifier ces faits, on a fait sur un nouvel extrait de feuilles d'Eucalyptus des traitements semblables à l'alcool à 95°, mais on a nettoyé auparavant l'extrait au plomb.

On a traité 400 gr. de feuilles d'Eucalyptus par l'alcool à 80° bouillant, et on a déféqué à fond par 80 cm³ de sous-acétate de plomb le résidu aqueux obtenu après distillation de cet alcool. Dans le filtrat, on a fait passer un courant d'hydrogène sulfuré jusqu'à précipitation totale du plomb, et on a évaporé à sec sous pression réduite le nouveau filtrat, à une température ne dépassant pas 50°. L'extrait a été alors traité comme dans les essais ci-dessus, tout d'abord par l'éther acétique (6 traitements de 500 cm³), et

ensuite, après élimination des dernières traces d'éther acétique, par l'alcool à 95°. Trois traitements de 1.000 cm³ ont été suffisants, le premier ayant donné 0 gr.,184 de sucres réducteurs pour 100 cm³, et les deux autres à peine 0 gr.,05 pour 100 cm³.

Les liqueurs alcooliques réunies ont été évaporées en présence de carbonate de chaux, et, l'extrait pesant 8 gr. a été repris par un alcool méthylique à 50 p. 100 environ, en quantité suffisante pour faire 250 cm³. On avait essayé cet alcool et on avait constaté qu'il s'y combinait 68,3 p. 100 de glucose. On doit faire remarquer que l'extrait obtenu dans l'alcool à 95° représente ici 2 p. 100 des feuilles, alors que, dans le premier essai fait sans défécation, l'extrait alcoolique représente 11 p. 100. La défécation à l'extrait de Saturne a donc permis l'élimination d'une forte proportion de matières étrangères.

On a fait agir l'émulsine. Les dosages de sucres ont donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	1 gr.,06 pour 100 cm ³	
— — le 7 ^e jour.....	0 gr.,907	—
— — le 14 ^e — ...	0 gr.,832	—
— — le 20 ^e —	0 gr.,785	—
— — le 45 ^e —	0 gr.,785	—
Nouvelle émulsine le 45 ^e jour		
Sucre réducteur le 55 ^e —	0 gr.,785	—

soit une diminution de 0 gr.,275 de sucre.

On vient de voir que, dans l'alcool méthylique utilisé, on combinait 68,3 p. 100 de glucose, le sucre disparu correspond donc à 0 gr.,402 de glucose, soit 37,9 p. 100 des produits réducteurs.

Afin de se rendre compte si, dans cet essai, on avait atteint l'équilibre, on a ajouté une quantité de glucose correspondant à 1 gr.,073 pour 100 cm³. On a laissé agir l'émulsine. Les dosages ont donné les résultats suivants :

Sucre réducteur après addition de glucose.	1 gr.,858 pour 100 cm ³	
— — le 10 ^e jour.....	1 gr.,611	—
— — le 20 ^e —	1 gr.,469	—
— — le 31 ^e —	1 gr.,414	—
Nouvelle émulsine le 31 ^e jour.		
Sucre réducteur le 45 ^e jour.....	1 gr.,175 pour 100 cm ³	
— — le 60 ^e —	1 gr.,162	—
— — le 71 ^e —	1 gr.,149	—
— — le 80 ^e —	1 gr.,111	—

soit une disparition de glucose de 0 gr.,747, or, la théorie donne 0 gr.,733. L'équilibre avait donc été atteint avant l'addition de glucose, puisque le glucose ajouté se combine dans les proportions prévues.

En comparant les résultats obtenus dans les trois essais faits sur les feuilles d'Eucalyptus, on peut voir que les proportions de glucose sont plus faibles dans les deux essais où l'on n'a pas fait de défécation : 34,7 et 29,80 p. 100, le troisième ayant donné 37,9. Cette différence est vraisemblablement due à ce que les produits précipités par l'extrait de Saturne ont une action empêchante sur le ferment.

De l'ensemble de ces essais, il se dégage tout d'abord qu'en extrayant le glucose au moyen de l'alcool à 95^e, d'un extrait déféqué à l'extrait de Saturne et épuisé par l'éther acétique, on ne dissout en plus du glucose que des quantités relativement faibles d'autres principes et qu'on arrive ainsi à supprimer ou à diminuer fortement l'action nocive d'un certain nombre de ces principes sur le ferment. C'est pourquoi, dans la méthode exposée dans le chapitre suivant, on a adopté ce mode opératoire.

CHAPITRE IV.

Méthode permettant l'application, aux végétaux, du procédé biochimique de caractérisation du glucose.

On traite la plante à essayer, fraîche ou sèche, par l'alcool bouillant, afin de tuer les ferments et de fixer sa composition. Dans cette première opération, on suivra exactement les indications données par BOURQUELOT, au sujet de la méthode biochimique qu'il a imaginée, en 1901, pour la recherche des glucosides et du sucre de canne dans les végétaux : On fait tomber la plante dans l'alcool bouillant, et on maintient l'ébullition pendant 20 minutes. On laisse refroidir, on décante cette première teinture, on broie la plante et on fait subir un deuxième traitement à l'alcool bouillant. Après refroidissement, on exprime à la presse, on filtre, on distille les deux liqueurs alcooliques, tout d'abord au B.-M. ; puis, quand tout l'alcool a été chassé, on évapore à sec, sous pression réduite. On obtient ainsi un extrait de plantes, privé de ferments.

L'extrait est dissous dans un volume déterminé d'eau, on défèque complètement la solution à l'extrait de Saturne, on sépare par essorage le précipité qu'on lave ensuite à l'eau distillée. On réunit les liqueurs de filtration et de lavage et on y élimine l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré. On filtre à nouveau et on évapore le filtrat à sec sous pression réduite sans dépasser $+ 50^{\circ}$ pour éviter l'action hydrolysante de l'acide acétique sur les hydrates de carbone et les glucosides pouvant se trouver dans l'extrait. On arrive ainsi à éliminer totalement l'acide acétique.

L'extrait ainsi purifié est épuisé par l'éther acétique hydraté bouillant, liquide qui ne dissout que des traces de sucre, et qui

enlève notamment les matières résineuses, les alcaloïdes, les glucosides, etc. Ces produits, étant solubles également dans l'alcool, seraient autant de matières étrangères pouvant gêner l'action de l'émulsine ou même fausser la recherche du glucose si l'on avait à faire à des glucosides. On arrête ces épuisements dès que l'éther acétique passe incolore, et on en chasse les dernières traces par distillation. L'extrait est ensuite traité à deux ou trois reprises par 1000 cm³ d'alcool à 95° bouillant, pendant 20 minutes et en agitant souvent. On laisse à chaque fois l'alcool en contact avec l'extrait pendant 24 heures, car, après refroidissement, certains produits solubles à chaud se précipitent, et on dose dans chaque liquide alcoolique les sucres réducteurs. Ces titrages permettent de limiter les traitements, et, en général, tous les sucres, passent en majorité dans le premier traitement.

Les liqueurs alcooliques réunies sont distillées et évaporées à sec, en présence de carbonate de chaux, qui assurera la neutralité du milieu, indispensable à l'action synthétique de l'émulsine. On obtient ainsi un extrait qu'on reprend à froid par l'alcool méthylique à 50 p. 100 en quantité suffisante pour faire après filtration 250 ou 500 cm³, quantité variable suivant la proportion de sucres réducteurs, déterminée approximativement par les dosages sur les liqueurs alcooliques. Le liquide après filtration, est alors prêt pour l'essai.

On procède à un premier dosage de sucres réducteurs, et on ajoute l'émulsine à la dose de 0,50 pour 100 cm³. La solution est abandonnée à la température du laboratoire, si celle-ci n'est pas inférieure à 15°, sinon, elle est placée à l'étuve à 20°-25° et agitée journellement. Tous les dix jours, en moyenne, on dose les sucres réducteurs ; s'il y a du glucose en solution, on constate une diminution progressive de leur quantité ; puis, cette diminution cesse. Cet arrêt de la réaction n'implique pas forcément qu'on a atteint l'équilibre. Il faut avoir recours à plusieurs vérifications :

1. Renouvellement du ferment ;
2. Essai du ferment ayant agi ;
3. Addition de glucose.

Renouvellement du ferment. — On enlève par filtration l'émulsine, et on ajoute une dose d'émulsine fraîche. La plupart du temps cette seconde addition de ferment suffit pour atteindre l'équilibre ; par

contre, comme on le verra plus tard, il a fallu dans certains cas, procéder à de nombreux renouvellements de ferment dont l'action était paralysée dès les premiers jours de contact et qui ne donnaient lieu qu'à des synthèses faibles. Quand le renouvellement du ferment n'amène aucun changement dans la composition des liquides, c'est que l'équilibre est atteint. Généralement, on constate que le renouvellement provoque une reprise de la réaction, mais peu marquée et de peu de durée.

2. *Essai du ferment ayant agi* — L'émulsine qu'on vient de recueillir est lavée à l'alcool à 95° et séchée à l'air. A 40 cm³ d'une solution de glucose à 2 p. 100 dans l'alcool méthylique à 50 p. 100, on ajoute 0 gr.,20 de l'émulsine à essayer, et on suit au polarimètre, la marche de la synthèse, en la comparant avec celle que produit une même quantité de ferment n'ayant pas agi. On constate que les émulsines retirées d'un liquide dans lesquelles la réaction a marché de façon normale, combinent le glucose à l'alcool méthylique presque aussi rapidement que le fait l'émulsine neuve.

Certains liquides, par contre, dans lesquels la synthèse avait été faible ont amené très rapidement une diminution considérable de l'activité de ferment qui n'agissait que peu ou point.

De l'essai du ferment, on peut tirer les conclusions suivantes : Une émulsine, retirée d'un milieu où la diminution des sucres réducteurs était arrêtée ou nulle, et gardant à l'essai une vitalité presque normale, donnait la preuve que l'équilibre était atteint dans le milieu. Au contraire, une émulsine dont la vitalité était nulle ou fortement atténuée, indiquait que dans le milieu où elle avait agi, il fallait changer fréquemment le ferment qui se détruisait facilement.

3. *Addition de glucose.* — Une autre vérification utilisée d'ailleurs très fréquemment dans les essais vus précédemment a été de provoquer une nouvelle mise en marche de la synthèse par addition de glucose en quantité connue, et de voir si celui-ci disparaissait dans les proportions prévues.

Mais la preuve irréfutable de la présence du glucose est l'extraction du méthylglucoside β . Les méthodes utilisées dans ce but

ont été celles qu'on a indiquées dans les essais sur les Fraises (1) et les feuilles d'Eucalyptus (2) qui peuvent servir de type aux deux cas qui se présentent le plus souvent : soit que le glucose existe en quantité notable (cas des Fraises), soit qu'il existe en faible quantité (cas des feuilles d'Eucalyptus).

(1) Page 24.

(2) Page 31.

CHAPITRE V.

Application du procédé biochimique de caractérisation du glucose aux fruits de *Viburnum opulus* L., à l'extrait de Quinquina rouge et à des extraits de Cola.

On a appliqué la méthode, telle qu'elle vient d'être décrite :

- I. — Aux fruits frais de *Viburnum opulus* L.
- II. — A l'extrait aqueux de Quinquina rouge du Codex 1908.
- III. — A l'extrait alcoolique de Cola du Codex de 1908.
- IV. — A un extrait alcoolique de Cola obtenu en traitant les noix fraîches par l'alcool bouillant.

I. — *VIBURNUM OPULUS* L.

On a traité par l'alcool bouillant 1.190 gr. de fruits non mûrs récoltés à Remiremont le 6 septembre 1920. Après distillation de l'alcool au B. M., il restait 790 cm³ de liqueur aqueuse, sur lesquels on a prélevé 133 cm³, correspondant à 200 gr. de fruits pour l'essai biochimique. Le reliquat de la liqueur aqueuse, correspondant à 990 gr. de fruits, a été évaporé à sec, et l'extrait a été mis à part.

Les résultats donnés par l'essai à l'invertine et à l'émulsine sont les suivants. Ils se rapportent à un liquide dont 100 cm³ correspondaient à 100 gr. de fruits.

Rotation initiale ($l = 2$).....	— 24'.
Rotation après action de l'invertine.....	— 50'.
Rotation après action de l'émulsine.....	— 45'.
Sucre réducteur initial.....	5 gr., 766.
Sucre réducteur après action de l'invertine.	6 gr., 232.
Sucre réducteur après action de l'émulsine..	6 gr., 232.

Sous l'action de l'invertine, on a observé un recul de la déviation vers la gauche de 26' avec formation de 0 gr., 466 de sucres réducteurs. L'indice est 1075, c'est-à-dire très éloigné de celui du saccharose, 603.

Sous l'action de l'émulsine, il ne s'est produit aucun changement dans la quantité des sucres réducteurs, bien que la rotation ait diminué de 5', diminution provenant sans doute d'un faible changement de température qui a fait varier le pouvoir rotatoire du lévulose existant dans le liquide essayé.

Cet essai mettait donc en évidence, en plus d'une faible proportion d'un sucre hydrolysable par l'invertine, une forte quantité de produits réducteurs, dans lesquels il a paru intéressant de caractériser le glucose.

Pour cela on s'est servi de l'extrait correspondant à 990 gr. de fruits, et, en suivant les indications données, on a obtenu, après défécation au plomb et épuisement à l'éther acétique, un extrait pesant 65 gr. L'alcool à 95° bouillant a dissous la majeure partie de cet extrait, 53 gr. dont 42 gr. de produits réducteurs. On a repris le résidu de l'évaporation de la liqueur alcoolique par un alcool méthylique à 50 pour 100 en quantité suffisante pour faire 500 cm³. Cet alcool méthylique avait été préalablement essayé, et on avait constaté qu'il s'y combinait 68,3 pour 100 de glucose. On a alors fait agir l'émulsine sur la solution méthylique et on a noté les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	7 gr., 500 pour 100 cm ³	
— — le 7 ^e jour.....	6 gr., 446	—
— — le 23 ^e jour.....	6 gr., 138	—
— — le 33 ^e jour.....	5 gr., 982	—
— — le 41 ^e jour.....	5 gr., 576	—
— — le 53 ^e jour.....	5 gr., 324	—
— — le 63 ^e jour.....	5 gr., 220	—
Nouvelle émulsine le 63 ^e jour.		
Sucre réducteur le 80 ^e jour.....	4 gr., 650	—
— — le 90 ^e jour.....	4 gr., 600	—

On a ensuite fait agir, à $+ 27^{\circ}$, 0,50 de chaque émulsine sur 50 cm³ d'une solution de galactose à 0 gr.,976 p. 100 dans l'alcool éthylique à 80°.

On a dosé le galactose restant dans chaque essai tous les cinq jours. Les résultats sont résumés dans le tableau p. 19.

On ne note donc aucun arrêt sensible dans la diminution de la proportion de galactose combiné, et on peut en conclure que le contact dans l'acétone à la température ordinaire n'amène aucune modification de l'activité de l'émulsine en tant que galactosidase β .

Si bien que tous les essais de caractérisation du glucose entrepris dans ce travail ont été faits avec l'émulsine ordinaire, pouvant évidemment amener la combinaison du galactose, et par là fausser l'essai quantitatif par excès ; mais, il n'en reste pas moins vrai que l'obtention du méthylglucoside β à l'état cristallisé et sa caractérisation par le pouvoir rotatoire sont des preuves suffisantes de la présence du glucose, le pouvoir rotatoire du méthylgalactoside β étant à peu près nul ($\alpha_D = -0^{\circ},419$) et celui du méthylglucoside β étant $\alpha_D = -32^{\circ},5$.

II. — EXTRAIT DE QUINQUINA ROUGE.

On a opéré sur 75 gr. d'extrait de Quinquina rouge préparé d'après les indications du Codex de 1908. La défécation à l'extrait de Saturne a éliminé 32 gr. de produits, le traitement à l'éther acétique 19 gr. Sur l'extrait ainsi purifié pesant 33 gr., on a fait quatre traitements de 1.000 cm³ à l'alcool à 95° bouillant.

Le premier a enlevé	1 gr.,240	de produits réducteurs.	
Le second —	1 gr.,190	—	—
Le troisième —	0 gr.,730	—	—
Le quatrième —	0 gr.,070	—	—
Soit en tout.....	3 gr.,230		

Les liqueurs alcooliques évaporées ont donné un extrait pesant 7 gr., soit un peu plus du double de la quantité de produits réducteurs. On a repris cet extrait par un alcool méthylique à 50 pour 100, en quantité suffisante pour faire 150 cm³. Cet alcool est le même que celui qu'on a utilisé dans l'essai précédent dans lequel il se combine 68,3 pour 100 du glucose.

On a fait agir l'émulsine, et on a noté les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	1 gr.,862	pour 100 cm ³	
— — le 6 ^e jour.....	1 gr.,77	—	
— — le 12 ^e jour.....	1 gr.,528	—	
— — le 18 ^e jour.....	1 gr.,475	—	
— — le 24 ^e jour.....	1 gr.,306	—	
— — le 49 ^e jour.....	1 gr.,306	—	
Nouvelle émulsine le 61 ^e jour.			
Sucre réducteur le 70 ^e jour.....	1 gr.,306	—	

Il y a donc eu 0 gr.,556 de sucre disparu, correspondant, dans l'alcool méthylique utilisé, à 0 gr.,814 de glucose, soit 43,6 pour 100 des produits réducteurs.

On a procédé ensuite aux vérifications recommandées dans la méthode générale, et on a pu avoir confirmation de la marche normale de l'action synthétique.

Les deux émulsines ayant agi dans la liqueur fermentaire ont été recueillies par filtration, et ont donné dans les solutions méthyliques de glucose où on les a essayées, les résultats suivants :

a) Pour l'émulsine recueillie le 61^e jour :

Déviatiou initiale.....	+ 2° 8'
— le 5 ^e jour.....	+ 1°40'
— le 16 ^e jour.....	+ 36'
— le 34 ^e jour.....	— 4'

b) Pour l'émulsine recueillie après arrêt de la synthèse :

Déviatiou initiale.....	+ 2°10'
— le 4 ^e jour.....	+ 1°48'
— le 13 ^e —	+ 1° 6'
— le 30 ^e —	+ 32'
— le 41 ^e —	+ 20'
— le 50 ^e —	+ 4'

Leur activité était donc encore très appréciable et le terme de la synthèse pouvait être considéré comme atteint.

Afin de s'assurer que le sucre disparu dans la réaction synthétique était bien du glucose, il restait à isoler le méthylglucoside β qui devait s'y trouver en très petite quantité, étant données les faibles proportions de sucre combiné. Pour cela, on a utilisé la méthode indiquée lors de la caractérisation du méthylglucoside β résultant de l'action de l'émulsine sur l'extrait de feuilles d'Eucalyptus (1). Ici encore, on a pu nettement obtenir des cristaux caractéristiques, après évaporation au B. M. de la liqueur éthéro-alcoolique sur un verre de montre.

En proposant la méthode, on a dit que les traitements à l'alcool à 95° ne devaient pas enlever la totalité des produits réducteurs contenus dans un extrait. L'essai sur l'extrait de Quinquina vient appuyer cette assertion. On a repris, en effet, l'extrait épuisé par l'alcool à 95° par de l'alcool méthylique à 50 p. 100 en quantité suffisante pour faire 200 cm³. La solution renfermait pour 100 cm³ 0 gr.,486 de sucres réducteurs ; sous l'action de l'émulsine, on a noté une disparition de 0 gr.,100 de sucres réducteurs. Il était donc resté dans l'extrait un peu de glucose, mais la majeure partie de ce produit était néanmoins passée dans l'alcool à 95°.

On peut faire remarquer à ce sujet que l'extrait de Quinquina déféqué et épuisé par l'éther acétique était très compact et ne se laissait que très difficilement pénétrer par l'alcool à 95° ; ce fait peut expliquer son épuisement incomplet, même par 4000 cm³ d'alcool à 95° bouillant.

En résumé, malgré la faible quantité de produits réducteurs existant dans l'extrait de Quinquina, on a pu y caractériser avec certitude la présence du glucose qui constituerait environ 43,6 pour 100 des produits réducteurs.

III. — EXTRAIT DE COLA DU CODEX DE 1908.

On a fait sur cet extrait deux essais ; l'un sur l'extrait tel qu'il existe dans les pharmacies, et l'autre sur ce même extrait ayant subi l'hydrolyse sulfurique.

a) Essai sur l'extrait non hydrolysé.

On a opéré sur 75 gr. d'extrait. Après la défécation à l'extrait de Saturne et les traitements à l'éther acétique, on a obtenu un extrait pesant 39 gr., dont l'alcool à 95° bouillant a dissous 30 gr. renfermant 6 gr. environ de produits réducteurs. L'extrait alcoolique a été repris par un alcool méthylique à 50 pour 100 environ, en quantité suffisante pour faire 200 cm³. Un essai préalable avait permis de constater qu'il se combinait dans cet alcool méthylique 68,3 pour 100 du glucose.

L'action de l'émulsine sur la liqueur méthylique a été excessivement lente, et il a fallu renouveler fréquemment le ferment avant d'atteindre le terme de l'action synthétique.

Aussi est-il particulièrement intéressant de suivre dans cet essai les chiffres donnés par les nombreux dosages de sucres qui s'échelonnent sur une longue période de près de six mois :

Sucre réducteur initial.....	2 gr.,676	pour 100 cm ³
— — le 7 ^e jour.....	2 gr.,620	—
— — le 15 ^e —	2 gr.,507	—
— — le 21 ^e —	2 gr.,507	—

Nouvelle émulsine le 22^e jour.

Sucre réducteur le 29 ^e —	2 gr.,397	—
— — le 35 ^e —	2 gr.,216	—
— — le 50 ^e —	2 gr.,216	—
— — le 60 ^e —	2 gr.,216	—

La synthèse paraissait donc terminée, ce qui était d'ailleurs normal après deux mois d'action fermentaire. Afin de s'en assurer on a procédé à une des vérifications qu'on a proposées dans la

méthode ; on a ajouté dans la liqueur méthylique une quantité de glucose correspondant à 0 gr.,875 pour 100 cm³. Cette addition a été faite au 60^e jour. Sous l'action de l'émulsine, les dosages ont donné les résultats suivants :

Sucre après addition de glucose.....	3 gr.,091 pour 100 cm ³	
Sucre réducteur le 73 ^e jour (13 jours d'action)	2 gr.,978	—
— — le 83 ^e — (23 jours d'action)	2 gr.,978	—
Nouvelle émulsine le 83 ^e jour.		
Sucre réducteur le 93 ^e jour.....	2 gr.,978	—
Nouvelle émulsine le 94 ^e jour.		
Sucre réducteur le 112 ^e jour.....	2 gr.,916	—
— — le 124 ^e —	2 gr.,696	—
— — le 135 ^e —	2 gr.,696	—

Après plus de 2 mois, on notait à peine la disparition de 0 gr.,395 de glucose. Comme dans l'alcool méthylique utilisé, sur 0 gr.,875 de glucose, il devrait y avoir 0 gr.,597 de glucose combiné, l'action synthétique, malgré les deux nouvelles additions d'émulsine était donc sensiblement retardée. On a renouvelé une fois de plus le ferment, et on a noté les résultats suivants :

Sucre réducteur le 147 ^e jour.....	2 gr.,223 pour 100 cm ³	
— — le 162 ^e —	2 gr.,223	—

La proportion de glucose combiné atteignait cette fois 0 gr.,868 pour 100 cm³, quantité nettement supérieure à celle prévue par la théorie.

Cet excédent de sucre disparu indiquait que l'action synthétique n'était pas terminée le 60^e jour, moment où on avait ajouté le glucose. Comme, d'autre part, à la lecture de ces différents résultats, on pouvait se rendre compte qu'une addition de ferment ne provoquait à chaque fois, qu'une faible réaction synthétique, il était bon de vérifier par une nouvelle addition d'émulsine, si la quantité de sucres réducteurs allait encore baisser.

Au 162^e jour, on a donc ajouté une nouvelle dose d'émulsine ; le sucre réducteur au 173^e jour était de 1 gr.,971 pour 100 cm³ et demeurait à ce taux dans un nouveau dosage fait le 183^e jour. Une nouvelle addition d'émulsine à cette dernière date restait enfin sans effet.

Finalement, après addition de glucose (0 gr.,875 pour 100 cm³),

on notait donc la disparition de 1 gr.,120 de sucre pour 100 cm³ (le sucre réducteur étant passé de 3 gr.,091 à 1 gr.,971). Or, on a ajouté 0 gr.,875 de glucose, dont il doit disparaître 0 gr.,597 sous l'action de l'émulsine ; on doit retirer cette quantité du sucre disparu. Il en reste $1,120 - 0,597 = 0,523$ appartenant à l'extrait de Cola et auquel on doit ajouter la quantité disparue dans les 60 premiers jours : 0 gr.,460, soit une quantité totale de : $0,523 + 0,460 = 0,983$ pour 100 cm³. Dans l'alcool méthylique utilisé, la synthèse intéressant 68,3 pour 100 du glucose en solution, cette quantité de 0 gr.,983 correspond à une proportion de glucose de 1 gr.,439 pour 100 cm³, soit 53,77 pour 100 du sucre réducteur initial.

La lenteur de l'action synthétique et la nécessité de renouvellements fréquents de l'émulsine, montrent que ce ferment était facilement détruit dans cette liqueur méthylique. On retrouvera le même fait, plus loin, dans un essai sur le même extrait ayant subi une hydrolyse sulfurique.

Les émulsines ayant successivement agi dans ce milieu ont été essayées, on les a numérotées de la façon suivante :

N° 1.	Emulsine retirée le 22 ^e jour.		
N° 2.	—	—	83° —
N° 3.	—	—	94° —
N° 4.	—	—	136° —
N° 5.	—	—	162° —

Les déviations observées au cours de ces essais dans une solution méthylique de glucose à 2 p. 100 ont été les suivantes. Dans la première colonne du tableau (p. 46), on trouvera les chiffres correspondant à l'action d'une émulsine neuve.

A part l'émulsine n° 1, toutes les autres émulsines n'ont plus qu'une faible activité ; le ferment est plus vite paralysé au fur et à mesure que la durée de l'essai augmente. En effet, les premiers dosages ont donné des quantités de sucres réducteurs régulièrement décroissantes, alors que, dès le premier renouvellement du ferment, on a constaté que la diminution du sucre ne se fait qu'au cours des premiers jours qui suivent l'addition du ferment. De sorte que si l'on n'avait pas procédé à l'une des vérifications indiquées dans la méthode générale, en l'occurrence à une addition de glucose, on n'aurait pas eu l'occasion de remarquer qu'après deux mois d'action fermentaire, le glucose existant dans l'extrait de Cola n'était que partiellement décelé.

Cette remarque s'impose encore avec plus de netteté dans l'essai suivant, où les premiers dosages donnaient des résultats semblant cadrer avec l'absence de glucose.

	EMULSINES					
	Neuve	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5
Déviatiou initiale.....	+2° 8'	+2° 8'	+2° 10'	+2° 10'	+2° 12'	+2° 10'
Déviatiou le 5 ^e jour.....	»	+2° 4'	+2° 8'	+2° 6'	»	»
— 10 ^e —	»	+1° 52'	»	»	»	»
— 14 ^e —	»	»	+1° 54'	»	+2° 6'	»
— 16 ^e —	»	»	»	+2° 2'	»	»
— 22 ^e —	»	»	»	»	»	+1° 50'
— 29 ^e —	— 14'	+1° 2'	+1° 40'	+1° 56'	+1° 52'	»
— 33 ^e —	— 20'	»	»	»	»	»
— 40 ^e —	»	+ 38'	+ 1° 8'	»	»	+1° 44'
— 47 ^e —	»	+ 30'	+ 1° 4'	+1° 48'	+1° 42'	»
— 67 ^e —	»	»	»	»	+1° 32'	+1° 40'
— 76 ^e —	»	— 6'	»	»	»	»
— 106 ^e —	»	— 16'	»	»	+1° 20'	»

b) Essai sur l'extrait hydrolysé.

On a dissous 75 gr. d'extrait dans un litre d'eau. On a additionné la solution obtenue de 30 gr. d'acide sulfurique, et on a chauffé à l'autoclave à + 105° pendant deux heures. Après refroidissement, on a filtré pour éliminer un précipité abondant qui s'était formé au cours de l'hydrolyse. Après défécation du filtrat à l'extrait de Saturne, on a obtenu un extrait pesant 51 gr. Les traitements à l'éther acétique ont enlevé 14 gr. de produits. L'alcool à 95° a ensuite dissous :

dans un premier traitement 10 gr. de produits réducteurs,
dans un second traitement 0 gr.,60 de produits réducteurs,
dans un troisième traitement 0 gr.,40 de produits réducteurs,
soit en tout 14 gr. de produits réducteurs.

L'évaporation des liqueurs alcooliques a fourni 28 gr. d'extrait,
qu'on a repris par le même alcool méthylique à 50 pour 100 que
dans les essais précédents, en quantité suffisante pour faire 250 cm³.

On a fait agir l'émulsine, et on a noté les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	3 gr.,431	pour 100 cm ³
— — le 13 ^e jour.	3 gr.,431	—
— — le 31 ^e —	3 gr.,431	—
Nouvelle émulsine le 32 ^e jour.		
Sucre réducteur le 41 ^e jour.....	3 gr.,146	—
— — le 52 ^e —	3 gr.,100	—
Nouvelle émulsine le 57 ^e jour.		
Sucre réducteur le 69 ^e jour.....	2 gr.,907	—
— — le 80 ^e —	2 gr.,832	—
Nouvelle émulsine le 81 ^e jour.		
Sucre réducteur le 89 ^e jour.....	2 gr.,703	—
— — le 102 ^e —	2 gr.,680	—
Nouvelle émulsine le 102 ^e jour.		
Sucre réducteur le 114 ^e jour.....	2 gr.,500	—
— — le 128 ^e —	2 gr.,400	—
Nouvelle émulsine le 129 ^e jour.		
Sucre réducteur le 140 ^e jour.....	2 gr.,400	—

La disparition du sucre atteint 1 gr.,031 pour 100 cm³, quantité
correspondant dans l'alcool méthylique utilisé, à 1 gr.,508 de
glucose, soit 43,95 pour 100 des sucres réducteurs.

La présence d'un produit gênant l'action fermentaire est peut-
être plus marquée dans cet essai que dans l'essai précédent,
puisque au début le ferment n'a pas agi pendant un mois. Il est
possible qu'il se soit fait, dans les premiers jours, au sein du
liquide, un précipité qui a englobé les particules d'émulsine, empê-
chant ainsi leur contact avec la solution. Ce n'est qu'au premier
renouvellement de ferment qu'on a constaté une action synthéti-
sante, action se continuant peu de jours et ne reprenant qu'à
chaque renouvellement. D'ailleurs, les émulsines retirées de cet
essai étaient fortement colorées.

Toutes ces émulsines ont été essayées, et numérotées dans
l'ordre suivant :

N° 1	émulsine	recueillie le	32° jour.
N° 2	—	—	le 57° —
N° 3	—	—	le 81° —
N° 4	—	—	le 102° —
N° 5	—	—	le 129° —
N° 6	—	—	à la fin de l'action.

Les déviations produites par chacune de ces émulsines dans une solution méthylque de glucose à 2 p. 100 furent les suivantes :

	EMULSINES					
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
Déviatiou initiale.....	+2° 8'	+2° 12'	+2° 12'	+2° 12'	+2° 10'	+2° 10'
Déviatiou le 6° jour.....	+2°	+1° 56'	»	»	»	»
— 9° —	»	»	+2° 2'	»	»	»
— 12° —	»	»	»	+1° 50'	»	+1° 34'
— 17° —	»	+1° 32'	»	»	»	»
— 19° —	+1° 46'	»	»	»	»	»
— 22° —	»	»	»	»	+1° 20'	»
— 28° —	+1° 32'	+1° 14'	»	+1° 38'	»	+1° 18'
— 45° —	+1° 2'	+ 40'	+1° 32'	+1° 18'	+1°	+1° 2'
— 53° —	»	»	+1° 16'	»	»	»
— 60° —	+1°	»	»	»	»	»
— 69° —	»	»	+1° 10'	+1° 10'	+ 52'	»
— 90° —	»	»	+1° 6'	+1° 6'	»	»

La présence d'un produit empêchant l'action du ferment se manifeste ici dès le début de l'essai, toutes les émulsines étant à peu près également paralysées.

En somme, malgré la forte diminution d'action du ferment, on est arrivé à déterminer la présence du glucose, existant dans la proportion de 43 pour 100 des produits réducteurs, alors que, par les premiers dosages, on aurait pu croire facilement à l'absence totale du glucose ; la nécessité du renouvellement et de l'essai au ferment est donc dans ce cas d'une évidence manifeste.

D'ailleurs, le méthylglucoside β formé a pu être isolé à l'état cristallisé, et caractérisé. Pour cela, on a suivi la marche générale qu'on a déjà indiquée, et les cristaux recueillis avaient comme pouvoir rotatoire $\alpha_D = -32^{\circ},6$.

$$[p = 0 \text{ gr.}, 1380 ; \quad \nu = 10 ; \quad l = 2 ; \quad \alpha = -54']$$

IV. — EXTRAIT DE NOIX DE COLA FRAICHES.

L'extrait existait au laboratoire et avait été préparé par M. HÉRISSEY en traitant à l'alcool bouillant un mélange de noix fraîches blanches et rouges. La distillation sous pression réduite avait eu lieu avec rentrée d'hydrogène. L'extrait ainsi obtenu était rougeâtre, translucide et s'étirait en fils.

L'essai biochimique des noix blanches et des noix rouges avait été fait par M. BRIDEL qui m'a communiqué les résultats ci-dessous : 100 cm³ correspondaient à 100 gr. de noix fraîches.

a) Noix blanches.

Déviati ⁿ initiale ($l=2$).....	+ 2° 5'
— après invertine.....	— 14'
— après émulsine.....	— 14'
Sucre réducteur initial.....	1 gr.,086
— — après invertine	2 gr. 526
— — — émulsine	2 gr.,526

soit un recul à gauche par l'invertine de 2°19' avec formation de 1 gr.,440 de sucre réducteur donnant ainsi un indice de 622, rapproché de celui du saccharose.

b) Noix rouges.

Déviati ⁿ initiale ($l=2$).....	+ 2° 5'
— après invertine.....	— 14'
— — émulsine.....	— 14'
Sucre réducteur initial.....	0 gr.,952
— — après invertine	2 gr.,322
— — — émulsine	2 gr.,322

soit un recul à gauche par l'invertine de 2°19' avec formation de 1 gr.,370 de sucre réducteur, donnant un indice de 591. Ces deux essais semblent donc indiquer la présence de saccharose en quantité assez abondante : 1 gr.,368 et 1 gr.,301 pour 100 gr. de noix.

Un dosage des matières réductrices avait été fait sur le liquide non déféqué et avait donné 4 gr.,450 de sucres réducteurs calculé en glucose pour 100 cm³. L'extrait de Saturne précipitait donc une notable partie de produits réducteurs, parmi lesquels se trouve la phloroglucine.

En possession de ces données, on a voulu savoir à combien de noix fraîches correspondait une quantité déterminée de l'extrait existant au laboratoire. On a fait un essai à l'invertine sur 10 gr. d'extrait dissous dans quantité suffisante d'eau toluénée pour faire 200 cm³. Les résultats furent les suivants :

Déviatiou initiale.....	+ 1°21'	pour 100 cm ³
— après invertine.....	+ 6'	—
Sucre réducteur initial.....	0 gr.,297	—
— — après invertine.	1 gr.,146	—

soit la formation de 0 gr.,849 de sucre réducteur pour 100 cm³ ou pour 5 gr. d'extrait. Or, d'après les résultats ci-dessus, on sait que 100 gr. du mélange de noix fraîches donnent, sous l'action de l'invertine, en prenant la moyenne des résultats des deux essais : 1 gr.,405 de sucre réducteur. Donc, 0 gr.,849 de sucre réducteur correspondent à 60 gr.,42 de noix fraîches ; autrement dit 60 gr.,42 de noix fraîches ont fourni 5 gr. d'extrait.

Pour caractériser le glucose dans cet extrait, on a également fait deux essais, l'un sur l'extrait lui-même, l'autre sur l'extrait après hydrolyse sulfurique.

a) Essai sur l'extrait non hydrolysé.

On a traité 75 gr. d'extrait. Après la défécation à l'extrait de Saturne et les traitements à l'éther acétique, on a obtenu un extrait pesant 27 gr. L'alcool à 95° a dissous 20 gr. de principes parmi lesquels 2 gr.,50 environ de produits réducteurs. On a repris l'extrait alcoolique par un alcool méthylique à 50 pour 100 en quantité suffisante pour faire 250 cm³. Cet alcool méthylique avait été préalablement essayé et on avait constaté qu'il s'y combinait 67,8 pour 100 de glucose.

L'action de l'émulsine a donné dans cet essai les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	1 gr.,028 pour 100 cm ³	
— — le 10 ^e jour.....	0 gr.,926	—
— — le 20 ^e —	0 gr.,926	—
Nouvelle émulsine le 21 ^e jour.		
Sucre réducteur le 31 ^e jour.....	0 gr.,893	—
Nouvelle émulsine le 35 ^e jour.		
Sucre réducteur le 51 ^e jour.....	0 gr.,886	—
— — le 57 ^e —	0 gr.,862	—

La quantité de sucre disparu, 0,166 pour 100 cm³, est donc très faible, et correspond dans cet essai à 0 gr.,244 de glucose, soit 21 gr.,78 pour 100 des sucres réducteurs.

La lenteur de la réaction pouvait faire soupçonner à nouveau la présence d'un produit paralysant le ferment, et c'est pourquoi on a renouvelé fréquemment l'émulsine. Mais, alors que dans les deux essais sur les extraits de noix de Cola sèches, à chaque addition d'émulsine, on constatait une disparition de glucose, faible, mais nettement marquée, ici, le renouvellement du ferment n'a provoqué que la disparition de minimes quantités de glucose, 0,01 à 0,03 pour 100 cm³. Il ne semblait donc pas que, dans cet essai, il y ait d'action nettement paralysante du ferment. Il fut d'ailleurs facile de s'en rendre compte en ajoutant une quantité déterminée de glucose: 0 gr.,503 pour 100 cm³. L'action fermentaire donna les résultats suivants:

Sucre après addition de glucose le	57 ^e jour	1 gr.,365 pour 100 cm ³	
— — — le	67 ^e —	1 gr.,289	—
— — — le	80 ^e —	1 gr.,289	—
Nouvelle émulsine le 80 ^e —			
— — — le	93 ^e —	1 gr.,014	—
— — — le	117 ^e —	1 gr.,014	—

soit une disparition de 0,351 de sucre alors que le calcul prévoit 0,341.

Le glucose ajouté a donc disparu dans les conditions voulues et on peut en conclure que la synthèse avait atteint le terme de l'équilibre dans cet essai.

On a essayé les diverses émulsines employées dans cette essai et on a reconnu que leur activité n'était que faiblement diminuée.

On a numéroté les émulsines dans l'ordre suivant :

N° 1	Emulsine recueillie le	21 ^e jour.
N° 2	— — — le	35 ^e —
N° 3	— — — le	80 ^e —
N° 4	— — — à la fin de l'essai,	

Dans une solution de glucose à 2 pour 100 dans l'alcool méthylique à 50 pour 100, ces émulsines ont donné les déviations suivantes :

	EMULSINES			
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
Déviatiou initiale.....	+2°10'	+2°10'	+2°12'	+2°10'
Déviatiou le 4 ^e jour.....	+2°	»	»	»
— 6 ^e —	»	+1°52'	»	»
— 13 ^e —	+1°28'	»	+1°40'	+ 34'
— 17 ^e —	«	+1°26'	»	»
— 27 ^e —	+ 54'	+1°	+1°10'	»
— 37 ^e —	+ 30'	»	»	»
— 45 ^e —	+ 20'	+ 40'	+ 46'	»
— 67 ^e —	»	»	+ 28'	»
— 100 ^e —	»	»	+ 10'	»

En comparant ce tableau aux deux tableaux donnés pages 46 et 48 où la synthèse était retardée, on peut voir qu'il existe une notable différence dans l'activité des deux séries d'émulsine ; les résultats ci-dessus ressemblent beaucoup plus à ceux qui ont été fournis par les émulsines de l'essai sur l'extrait de Quinquina où l'action synthétique a été normale.

On peut donc penser que si l'action fermentaire a paru longue dans cet essai, cela était plutôt dû à la faible proportion de glucose qu'à la présence d'un principe toxique pour l'émulsine comme dans les deux essais précédents.

Cette hypothèse se confirmera dans l'essai suivant fait sur le même extrait hydrolysé où la proportion de glucose était beaucoup plus élevée.

Essai sur l'extrait hydrolysé.

On a dissous 75 gr. d'extrait dans 1.000 cm³ d'eau et on a traité cette solution deux heures à l'autoclave à + 105° après addition de 30 gr. d'acide sulfurique pur. Par refroidissement, il s'est déposé un abondant précipité bien aggloméré de couleur rouge brun. On a décanté la liqueur surnageante, et essoré le précipité qui, après lavage et dessiccation, pesait 30 gr.

Les liqueurs de filtration réunies ont donné, après défécation, un extrait pesant 28 gr., sur lequel l'éther acétique a enlevé 6 gr. de produits, et l'alcool à 95°, 15 gr. de principes dont 7 gr. de produits réducteurs.

On a repris l'extrait provenant de l'évaporation des liqueurs alcooliques par un alcool méthylique à 50 pour 100, en quantité suffisante pour faire 250 cm³. On savait, par un essai préalable, que le glucose se combinait dans cet alcool méthylique jusqu'à disparition de 67,8 pour 100.

L'action de l'émulsine a donné les résultats suivants :

Sucre réducteur initial.....	2 gr.,745	pour 100 cm ³
— — le 9 ^e jour.....	2 gr.,162	—
— — le 19 ^e jour.....	1 gr.,898	—
— — le 29 ^e jour.....	1 gr.,795	—
— — le 40 ^e jour.....	1 gr.,780	—

Nouvelle emulsine le 40^e jour.

Sucre réducteur le 61 ^e jour.....	1 gr.,636	—
— — le 71 ^e jour.....	1 gr.,636	—

soit une disparition de 0,909 de sucre correspondant à 1 gr.,340 de glucose, c'est-à-dire 48,8 pour 100 des sucres réducteurs.

L'action synthétique n'a donc été nullement gênée et les essais des deux émulsines viennent en confirmer la marche normale. Les déviations observées dans une solution à 2 pour 100 de glucose dans l'alcool méthylique à 50 pour 100 furent les suivantes :

Emulsine recueillie le 40 ^e jour.			Emulsine recueillie à la fin de l'essai.		
Déviati	on initiale.....	+ 2°12'	Déviati	on initiale.....	+ 2°12'
—	le 7 ^e jour....	+ 1°46'	—	le 14 ^e jour...	+ 32'
—	le 22 ^e jour....	+ 1° 6'	—	le 30 ^e jour...	+ 2'
—	le 48 ^e jour....	+ 20'	—	le 47 ^e jour...	— 16'
—	le 56 ^e jour....	+ 4			
—	le 84 ^e jour....	± 0			

L'arrêt de la diminution des sucres réducteurs, d'une part, et la vitalité encore très appréciable de l'émulsine retirée de la liqueur fermentaire, d'autre part, sont un contrôle probant de la fin de la synthèse.

Enfin, on a pu isoler et caractériser le méthylglucoside β formé. En effet, après évaporation de la liqueur fermentaire et épuisement de cet extrait tel qu'il a été indiqué dans l'essai sur les Fraises, on a obtenu un produit cristallisé ayant comme pouvoir rotatoire $\alpha_D = -33^{\circ},5$

$$(p = 0,0399 ; \quad v = 10 ; \quad l = 2 ; \quad \alpha = -14^{\circ})$$

Si le glucose existe en très faible proportion dans l'extrait de Cola (noix fraîches), l'hydrolyse en amène la formation d'une forte quantité, provenant du saccharose dont l'essai biochimique a décelé la présence et peut-être aussi du complexe contenant la caféine, dont un des produits d'hydrolyse a été recueilli sous forme d'une poudre rouge brun après le traitement à l'autoclave.

CONCLUSIONS.

La méthode biochimique de caractérisation du glucose est donc applicable aux végétaux. Si ceux-ci ne renferment, à côté des matières sucrées, qu'une faible proportion de produits étrangers, un simple traitement à l'alcool bouillant est suffisant, ainsi qu'on a pu s'en rendre compte par les essais effectués sur les Raisins et sur les Fraises. Mais, exception faite de quelques fruits, ce cas se présente assez rarement, et la plupart du temps, on se trouve en présence d'un milieu complexe où les sucres sont en très faible quantité. Une purification préalable est alors nécessaire, et c'est pour rendre cette méthode de recherche du glucose applicable aux végétaux en général qu'on a donné la méthode suivante :

On prépare, en traitant les végétaux par l'alcool bouillant, un extrait débarrassé de ferments, et on purifie cet extrait dissous dans l'eau en le déféquant au sous-acétate de plomb. Sur le nouvel extrait obtenu par évaporation des liqueurs déféquées dans lesquelles le plomb en excès a été éliminé par un courant d'hydrogène sulfuré, on procède à des épuisements : 1° à l'éther acétique hydraté et bouillant qui enlève un certain nombre de principes : matières grasses, matières résineuses, alcaloïdes, glucosides, etc. 2° à l'alcool à 95° bouillant, qui dissout les sucres. On évapore à sec les liqueurs alcooliques, et c'est sur la dissolution de cet extrait alcoolique dans l'alcool méthylique à 50 pour 100 qu'on fait agir l'émulsine.

S'il y a du glucose, on constate une diminution progressive des sucres réducteurs jusqu'à ce que l'équilibre fermentaire soit atteint. On pourra même faire une évaluation approximative de la quantité de glucose en s'appuyant sur ce fait que l'émulsine combine, dans l'alcool méthylique à 50 p. 100, 69 p. 100 du glucose existant en solution.

Malgré ces purifications successives de l'extrait à essayer, il n'est pas toujours possible d'obtenir une synthèse à marche régu-

lière et normale comme cela a lieu dans une solution méthylique de glucose pur. Pour être certain de l'arrêt de la réaction synthétique, il est nécessaire d'avoir recours à plusieurs vérifications.

1° Renouvellement du ferment.

2° Essai du ferment ayant agi.

3° Addition de glucose.

Ainsi, dans l'extrait de noix de Cola sèches, c'est une addition d'une quantité connue de glucose qui a fait découvrir que la synthèse n'était pas terminée au moment de cette addition, et, dans le même extrait hydrolysé, seul, le renouvellement fréquent du ferment a pu permettre d'atteindre le terme de la synthèse. Dans ces deux cas, l'essai du ferment ayant agi a montré qu'il avait été rapidement détruit.

La méthode proposée n'a pas la prétention d'être une méthode de dosage rigoureusement exacte du glucose existant dans les végétaux. L'alcool à 95° est un excellent dissolvant du glucose, mais, ainsi qu'on l'a reconnu au cours des recherches sur l'extrait de Quinquina rouge, il peut arriver que l'on ne parvienne pas à extraire par ce dissolvant la totalité du glucose dont une minime quantité reste englobée dans la partie insoluble de l'extrait, et échappe ainsi à la réaction.

Il faut encore envisager comme possible la présence du galactose libre dans les végétaux. Ce sucre se dissoudra dans l'alcool à 95° à la faveur d'autres principes et passera ensuite en solution dans l'alcool méthylique. Sous l'action de la galactosidase β qui existe dans l'émulsine des amandes, il donnera du méthylgalactoside β dont la formation correspond à une diminution de sucre réducteur. C'est pour remédier à ce trouble possible de la réaction qu'on avait essayé de préparer une émulsine sans galactosidase β . Mais on a vu que ces essais ont été infructueux.

Aussi, ne s'est-on jamais contenté d'affirmer la présence du glucose en s'appuyant uniquement sur la diminution de la quantité des produits réducteurs dans les liquides essayés. On a tenu à extraire, à l'état cristallisé, le produit de la réaction : le méthylglucoside β , dont l'obtention apporte la preuve irréfutable de la présence du glucose.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

Dans les fruits analysés: Fraises, Raisins, *Viburnum opulus* L., on est parvenu à caractériser le glucose dans la proportion de 50 p. 100 environ des sucres réducteurs, ce qui est, en somme, la réalité, puisqu'on se trouve, dans les fruits, en présence de sucre interverti (1).

Dans les autres extraits essayés, le glucose a été reconnu dans les proportions suivantes par rapport aux produits réducteurs ayant passé dans l'alcool à 95°.

1.	Pour les feuilles d'Eucalyptus.....	37,9 p. 100
2.	— l'extrait de Quinquina.....	43,6 —
3.	— — noix de Cola sèches non hydrolysé...	53,7 —
	— — — hydrolysé...	43,9 —
4.	— — noix de Cola fraîches non hydrolysé.	21,7 —
	— — — hydrolysé.	48,8 —

En outre, on a retiré le méthylglucoside β à l'état cristallisé des essais sur : les Fraises, les feuilles sèches d'*Eucalyptus globulus* L., les fruits non murs de *Viburnum opulus* L., l'extrait de Quinquina, l'extrait hydrolysé de noix de Cola sèches, l'extrait hydrolysé de noix de Cola fraîches.

L'application exacte de la méthode proposée permet donc de déceler avec certitude le glucose dans un extrait végétal, quelle que soit la proportion dans laquelle existe ce sucre.

(1) H. BUIGNET. — Examen chimique de la Fraise et analyse comparée de ses diverses espèces (*Journ. Pharm. Chim.*, [3], XXXVI, p. 81, p. 170, 1859).

— Recherches sur la matière sucrée contenue dans les fruits acides, son origine, sa nature, ses transformations (*Journ. Pharm. Chim.*, [3], XXXIX, p. 81, 1861).

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,
BOUGAULT.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,
H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
P. APPELL.

TABLE DES MATIERES.

	Pages
INTRODUCTION.....	5
CHAPITRE PREMIER. — Sur la préparation de l'émulsine des amandes au moyen de divers agents de précipitation	11
— II. — Essai de caractérisation biochimique du glucose dans les Fraises et les Raisins	21
I. — Fraises	21
II. — Raisins.....	25
— III. — Essai de caractérisation biochimique du glucose dans les feuilles sèches d' <i>Eucalyptus glo-</i> <i>bulus</i> L.....	29
— IV. — Méthode permettant l'application aux végétaux du procédé biochimique de caractérisation du glucose	34
— V. — Application du procédé biochimique de carac- térisation du glucose aux fruits de <i>Viburnum</i> <i>opulus</i> L.. à l'extrait de Quinquina rouge et à des extraits de Cola.....	38
I. — Aux fruits frais de <i>Viburnum opulus</i> L.	38
II. — A l'extrait aqueux de Quinquina rouge du Codex de 1908.....	41
III. — A l'extrait alcoolique de Cola du Codex de 1908.....	43
a) Essai sur l'extrait non hydro- lysé	43
b) Essai sur l'essai hydrolysé....	46
IV. — A un extrait alcoolique de Cola (noix fraîches).....	49
a) Essai sur l'extrait non hydro- lysé	50
b) Essai sur l'extrait hydrolysé..	53
CONCLUSIONS.....	55

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE L. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.
